

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



**Facoltà di Scienze MM. FF. NN.**

**Dipartimento di Scienze Biologiche**

**Dottorato di ricerca in Biologia avanzata**

**XXVI ciclo**

STUDIO MOLECOLARE DEGLI EFFETTI DEI TOCOTRIENOLI E DELLA TRF  
(TOCOTRIENOL-RICH FRACTION), ESTRATTI DALL'OLIO DI PALMA (*E. guineensis*),  
SULL'INDUZIONE DELLO STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO  
IN CELLULE UMANE DI CANCRO DELLA CERVICE UTERINA (*HeLa cells*).

**Coordinaore**

Ch.mo Prof.  
Luciano Gaudio

**Tutor**

Ch.mo Prof.  
Piero Andreuccetti

**Candidato**

Giovanni Capasso

**Cotutor**

Ch.ma Prof.ssa  
Anna Cardone

**Anno accademico 2012/2013**

## Indice

ABSTRACT

INTRODUZIONE

• Tocoferoli e tocotrienoli	pag. 9
• La struttura chimica di tocoferoli e tocotrienoli	pag. 14
• Biosintesi di tocoferoli e tocotrienoli	pag. 20
• Fonti della vitamina E	pag. 26
• Metabolismo ed assorbimento della vitamina E	pag. 34
• Attività biologiche di tocoferoli e tocotrienoli	pag. 41
• Il reticolo endoplasmatico	pag. 63
• Struttura generale del reticolo endoplasmatico	pag. 65
• Le funzioni del reticolo endoplasmatico	pag. 68
• L'ER e la degradazione proteica	pag. 71
• Aspetti generali della UPR	pag. 76
• IRE-1: il ramo centrale della UPR	pag. 79
• ATF6: la UPR e la proteolisi regolati	pag. 86
• PERK: la UPR e il controllo traduzionale	pag. 90
• Integrazione delle risposte dei rami della UPR	pag. 94
• UPR e metabolismo cellulare	pag. 96
• UPR e patologie	pag. 97
• Apoptosi	pag. 103
• Caratteri morfologici delle cellule apoptotiche	pag. 105

- Aspetti biochimici dell'apoptosi: via intrinseca e via estrinseca pag. 110

## SCOPO DELLA TESI

- Finalità del lavoro pag. 122

## MATERIALI E METODI

- Linea cellulare e trattamenti pag. 125
- DNA laddering pag. 130
- Microscopia a fluorescenza pag. 131
- Calcium Assay pag. 133
- Analisi dei microarray pag. 134
- Analisi dei meccanismi pag. 137
- Estrazione dell'RNA pag. 139
- Real time PCR pag. 141
- Retrotrascrizione, amplificazione e digestione di XBP-1 pag. 146
- Estrazione proteica e western blot pag. 151
- Analisi dell'attività caspasica pag. 162
- Analisi statistica pag. 166

## RISULTATI

- Effetti della TRF e dei tocotrienoli pag. 169
- Identificazione di meccanismi molecolari differenti modulati dai T3s nelle HeLa cells pag. 175

- I trattamenti con i T3s inducono rilascio di calcio dal reticolo pag. 192
- I trattamenti con i T3s inducono stress del reticolo pag. 195
- I trattamenti con i T3s attivano il pathway di IRE-1 $\alpha$  pag. 200
- Effetti dei trattamenti con T3s sull'attività delle caspasi pag. 204

## DISCUSSIONE

## BIBLIOGRAFIA

- Articoli scientifici pag. 227



## ABSTRACT

I tocotrienoli differiscono dai tocotrienoli tra loro per l'insaturazione della catena fitilica laterale. È noto un ampio insieme di proprietà biologiche delle prime isoforme che non sono espresse dai tocoferoli, i cui meccanismi molecolari d'azione sono ancora scarsamente compresi.

Recentemente, sulla base delle evidenze sperimentali derivanti da studi *in silico* e *in vitro*, è stato evidenziato che gli effetti di forme specifiche di tocotrienoli ( $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo) sull'espressione genica è mediata, almeno in parte, dall'attivazione del recettore  $\beta$  degli estrogeni in cellule delle linee MDA-MB-231 e MCF-7.

L'insieme dei dati trascrittomici ottenuti da questi studi, attraverso approcci bioinformatici, ha aperto la strada alla ricerca di un *pathway* alternativo, attivato dalle forme specifiche di tocotrienoli, che conduce all'arresto della crescita e della proliferazione, nonché all'apoptosi in cellule tumorali che non esprimono recettori per gli estrogeni.

Lo studio presentato, condotto sulle cellule HeLa, che non esprimono le suddette isoforme recettoriali, indica che l'attività dei tocotrienoli è ascrivibile all'induzione di condizioni di stress a livello del reticolo endoplasmatico.

Il presente lavoro, infatti, partendo dall'analisi dei dati delle piattaforme trascrittomiche, dimostra che i trattamenti con  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo sono associati a specifici segnali  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti, all'espressione e l'attivazione di IRE-1 $\alpha$  ed altre molecole implicate nell'*Unfolded Protein Response*, il sistema di segnalazione centrale di cui le cellule eucariotiche dispongono per fronteggiare le condizioni di stress del reticolo endoplasmatico, conducendo infine all'apoptosi.

## INTRODUZIONE

## **Tocoferoli e tocotrienoli**

Il fondamentale ruolo per alcuni alimenti nel garantire un certo grado di salubrità alla vita, era già noto fin dal passato. Nell'antichità, infatti, lo stesso Ippocrate aveva descritto la cecità e aveva raccomandato l'aumento di consumo di «fegato di bue immerso nel miele», intuendo come gli alimenti fossero la fonte di fattori utili a prevenire tale stato di morbosità.

Nei secoli successivi, gli osservatori continuarono a riportare che determinati malesseri erano apparentemente connessi alle abitudini alimentari e, in particolare, a “sostanze tossiche” contenute nei cibi.

Successivamente divenne nota la prevenzione del beriberi dovuta all'introduzione di riso integrale nella dieta, la cura dello scorbuto derivante dal consumo di agrumi, il rafforzamento della fertilità quale conseguenza di un'alimentazione ricca di vegetali in foglie.

Nel 1912 lo scienziato polacco Cashmir Funk coniò il termine «vitamine» - da “vita”, per il ruolo vitale di tali sostanze e “amine”, per la natura (tiamine) dei primi composti che egli isolò dalla crusca di riso – per l'insieme di fattori

derivanti dai prodotti alimentari per i quali erano già state riconosciute proprietà benefiche, volte a curare o prevenire molti stati patologici. L'appellativo si riferisce proprio alla capacità di tali sostanze di sostenere e rafforzare molti degli aspetti di un corretto stato di buona salute.

La maggior parte delle vitamine scoperte fino all'epoca della loro definizione, aveva natura idrofilica. La scoperta delle vitamine liposolubili, infatti, è successiva, e per esse segue la classificazione cronologica, in base all'ordine di scoperta, secondo la successione delle lettere dell'alfabeto.

Nel 1922 l'embriologo Herbert Evans e la sua assistente Katherine Bishop isolarono per la prima volta, da verdure verdi in foglia, il fattore X – successivamente chiamato vitamina E perché la sua scoperta seguiva quella della vitamina D – di natura lipofila e descritto come un elemento imprescindibile favorente la fertilità, in grado di prevenire la morte fetale in animali da laboratorio per i quali era garantita l'assunzione attraverso l'alimentazione.

La vitamina E fu denominata «tocoferolo» nel 1924, una volta compresa la sua struttura. Il termine deriva, infatti, dalla parola greca “*tokos*” che significa “nascita”, e “*phero*” che significa “condurre”, e il suffisso “-olo”, per indicare le

proprietà alcoliche della molecola. Nel 1938 fu sintetizzata chimicamente come racemo di *d,l*- $\alpha$ -tocoferolo da Karrer (Chandan *et al.*, 2007).

L' $\alpha$ -tocoferolo fu la prima forma della vitamina E ad essere rinvenuta e destinata a divenire il capostipite di un'intera classe (*tocopherols/TPs*), costituita da altri tre isomeri, distinti anch'essi con le altre lettere dell'alfabeto greco  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Successivamente vennero isolati e identificati ulteriori quattro analoghi molecolari, raggruppati in un'ulteriore classe e denominati rispettivamente  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienoli (*tocotrienols/T3s*).

Il termine “tocotrienoli” fu introdotto da Bunyan *et al.* (1961) per indicare tali molecole descritte come «tocoferoli con una vera (dall'inglese *true*) catena isoprenoide».

Nel 1964 furono descritti i T3s sulla rivista “Nature”, che erano stati isolati dal lattice della pianta della gomma, *Havea brasiliensis* (Dunphy *et al.*, 1965; Whittle *et al.*, 1966).

Le otto isoforme di tocoferoli e tocotrienoli sono collettivamente denominate “tococromanoli”.

Attualmente il termine «vitamina E» è un descrittore generico utilizzato impropriamente non per identificare una singola molecola naturale o di sintesi quanto, piuttosto, l'intera famiglia che racchiude le classi di composti sopra citate, i cui componenti condividono con la vitamina la natura liposolubile e le caratteristiche antiossidanti, ma dotati di attività di diversa potenza, caratteristica per la quale sono stati rivestiti, per molto tempo, di minore attenzione.

L'attività biologica delle isoforme di tocoferoli e tocotrienoli viene espressa in termini di equivalenti di  $\alpha$ -tocoferolo (pari a 1,5 IU<sup>1</sup>), essendo quest'ultimo il composto con maggiore attività, ed il punto di riferimento per ogni confronto.

---

<sup>1</sup> L'IU (*international unit*), in farmacologia, è l'unità di misura che esprime la quantità, riferita alla sua attività biologica, di una qualsiasi sostanza dotata di principio attivo, come vitamine o ormoni, nonché determinati farmaci.



---

RAB – Relative Antioxidant Biopotency	
$\alpha$ -tocoferolo	100%
$\beta$ -tocoferolo	56%
$\gamma$ -tocoferolo	16%
$\delta$ -tocoferolo	-

---

**Tab. 1i:** Attività vitaminica relativa dei tocoferoli (Leth e Sondergaard, 1977)

### **La struttura chimica di tocoferoli e tocotrienoli**

La vitamina E è uno dei più importanti fitonutrienti contenuti negli oli alimentari. Come precedentemente accennato, essa consta di otto isoforme naturali.

I TP e i T3, le due classi che costituiscono la famiglia della vitamina E, si presentano rispettivamente sotto forma di quattro isomeri, opportunamente distinti con le lettere dell'alfabeto greco  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -. Tali isoforme differiscono per il numero e la posizione dei gruppi metilici sull'anello cromanolico.

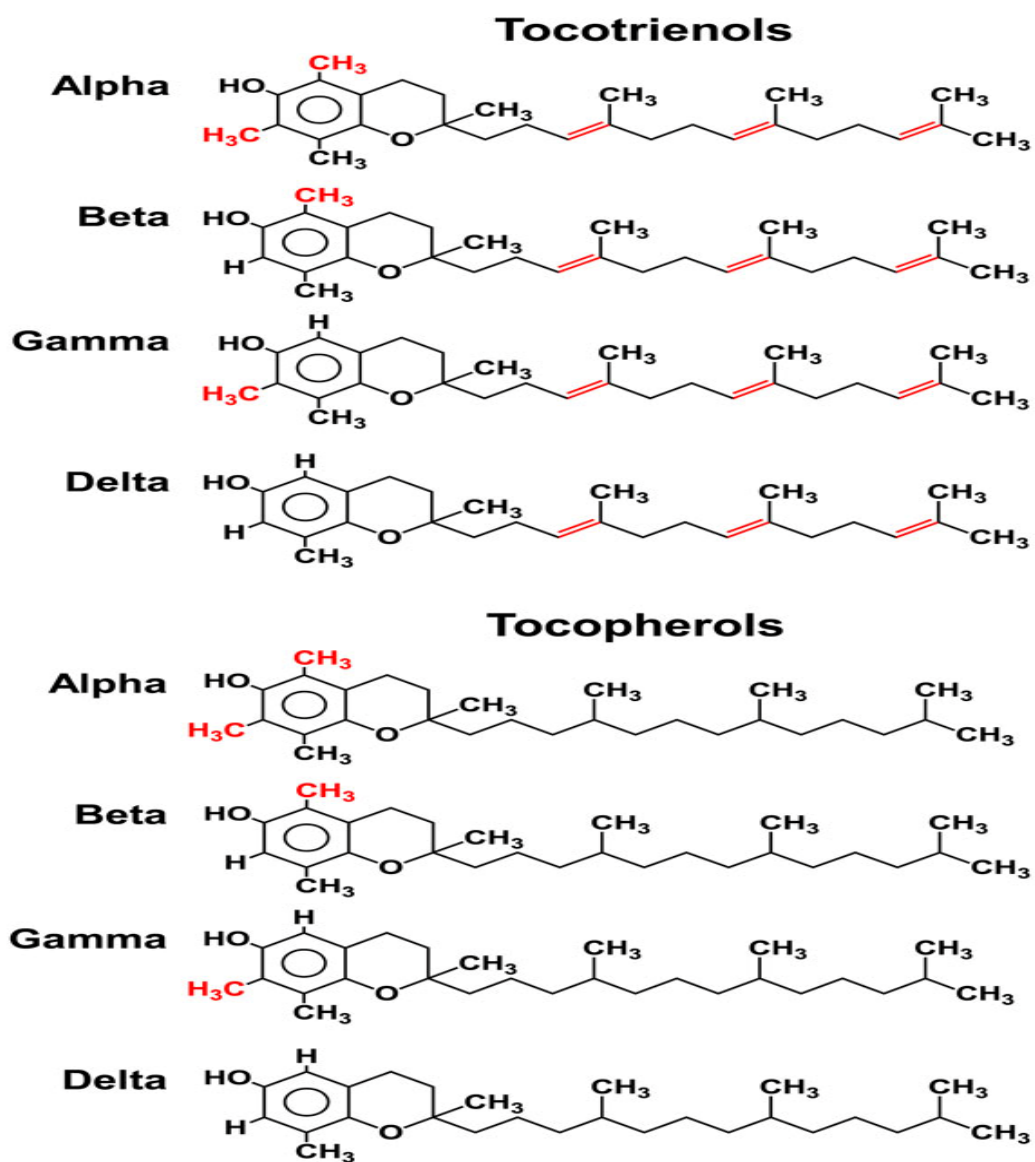


Fig. 4i: Struttura molecolare dei tococromanoli (Aggarwal *et al.*, 2011)

Tocoferoli e tocotrienoli condividono le seguenti caratteristiche comuni:

- la testa, costituita dall'anello cromanolico;
- la coda, la catena alifatica laterale definita fitilica o isoprenoide nei tocoferoli;
- il gruppo idrossilico attivo, localizzato sulla testa ([www.tocotrienols.com](http://www.tocotrienols.com)).

L'anello cromanolico è costituito da un nucleo benzenico condensato con un nucleo piranico, avente un gruppo metilico sul carbonio in posizione 2.

Le classi precedentemente definite sono distinte in base a determinate caratteristiche strutturali delle molecole che le costituiscono.

I TP presentano tre centri stereogenici a livello dei carboni in posizione 2, 4 e 8, mentre i T3 un singolo centro a livello del carbonio in posizione 2.

Altro elemento utile alla distinzione tra le classi è la natura insatura o satura della catena laterale alifatica: i tocotrienoli differiscono strutturalmente dai tocoferoli per la presenza di tre doppi legami *trans* nelle posizioni 3', 7' e 11'.

Per la presenza dell'insaturazione e la conseguenziale rigidità delle molecole, è stato ipotizzato che i tocotrienoli assumono una conformazione unica

(Atkinson, 2006). L' $\alpha$ -tocotrienolo presenta, però, una maggiore flessibilità della catena isoprenoide e ciò conferma l'ipotesi che tali molecole conferiscano una maggiore flessibilità alle membrane fosfolipidiche con le quali interagiscono e si riconosce, in generale, per l'intera classe di composti, un importante ruolo nella riduzione dello stress ossidativo, ma l'effettiva attività biologica non è ancora completamente chiarita (Hunter *et al.*, 2007). Tra le proprietà conferite dall'insaturazione della catena laterale si riconosce la capacità dei tocotrienoli di interagire, non solo con i lipidi, ma anche con molecole proteiche cellulari (Atkinson *et al.*, 2008).

Inoltre, l'anello cromanolico dei T3, oltre alla funzione antiossidante dovuta alla presenza del gruppo ossidrilico a livello del carbonio in posizione 6, è responsabile di specifiche attività di segnalazione riconosciute a tali molecole e che le distinguono tra gli altri componenti della famiglia della vitamina E (Galli e Azzi, 2010).

Gli schemi di metilazione dell'anello cromanolico, associati al motivo prenilato delle catene laterali – caratteri tipici della prima isoforma ( $\alpha$ ) di tocoferolo scoperta e descritta – determinano il destino di tali molecole in termini

di biodisponibilità e trasformazione. Per la vitamina E introdotta con l'alimentazione, tali risposte dipendono da specifiche vie che sono sotto l'influenza della proteina epatica  $\alpha$ -TTP ( *$\alpha$ -tocopherol transfer protein*). Essa è considerata il prototipo di proteina che lega la vitamina E, di cui regola l'assorbimento e il trasporto di tutte le isoforme (vd. oltre). Inoltre, tale proteina lega la forma completamente metilata e satura dell' $\alpha$ -TP con un'affinità almeno 10 volte superiore delle altre forme di T3 (Hosomi *et al.*, 1997).

Studi sulla relazione struttura-funzione dimostrano che la mancata insaturazione della catena laterale dei tocotrienoli, combinata ad un anello cromanolico ipometilato, è associata a specifiche caratteristiche chimico-fisiche e a particolari funzioni ben più potenti, che suscitano un interesse crescente nei campi della nutrizione e della farmacologia (Sontag and Parker, 2007; Atkinson *et al.*, 2008; Viola *et al.*, 2011).

	R1	R2	R3
<b><math>\alpha</math>-tocoferolo</b> <b><math>\alpha</math>-tocotrienolo</b>	$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$
<b><math>\beta</math>-tocoferolo</b> <b><math>\beta</math>-tocotrienolo</b>	$-CH_3$	$-H$	$-CH_3$
<b><math>\gamma</math>-tocoferolo</b> <b><math>\gamma</math>-tocotrienolo</b>	$-H$	$-CH_3$	$-CH_3$
<b><math>\delta</math>-tocoferolo</b> <b><math>\delta</math>-tocotrienolo</b>	$-H$	$-H$	$-CH_3$

**Tab. 2i:** Localizzazione dei gruppi metilici sull'anello cromanolico nei tocoferoli e tocotrienoli.

### **Biosintesi di tocoferoli e tocotrienoli**

Gli enzimi dell'apparato biosintetico della vitamina E sono stati rinvenuti in cloroplasti, cromoplasti e, presumibilmente, in tutti i plastidi, con localizzazione specifica, immersi cioè, nella maggior parte dei casi, negli strati lipidici delle membrane interne di tali organelli.

Il contenuto di vitamina E aumenta durante la senescenza, la transizione dei cloroplasti in cromoplasti e, in particolare, durante lo sviluppo del seme. Essa infatti, di natura lipofila, si concentra in prevalenza nei tessuti di riserva, non metabolicamente attivi, dove previene l'ossidazione dei lipidi di membrana e di riserva.

I tococromanoli favoriscono il mantenimento di un tasso ottimale della fotosintesi (Porfirova *et al.*, 2002), proteggendola dal fotodanno, dall'attacco radicalico dell'ossigeno singoletto al fotosistema II in condizioni di elevata illuminazione o dallo stress causate dalle basse temperature (Hunter *et al.*, 2007).



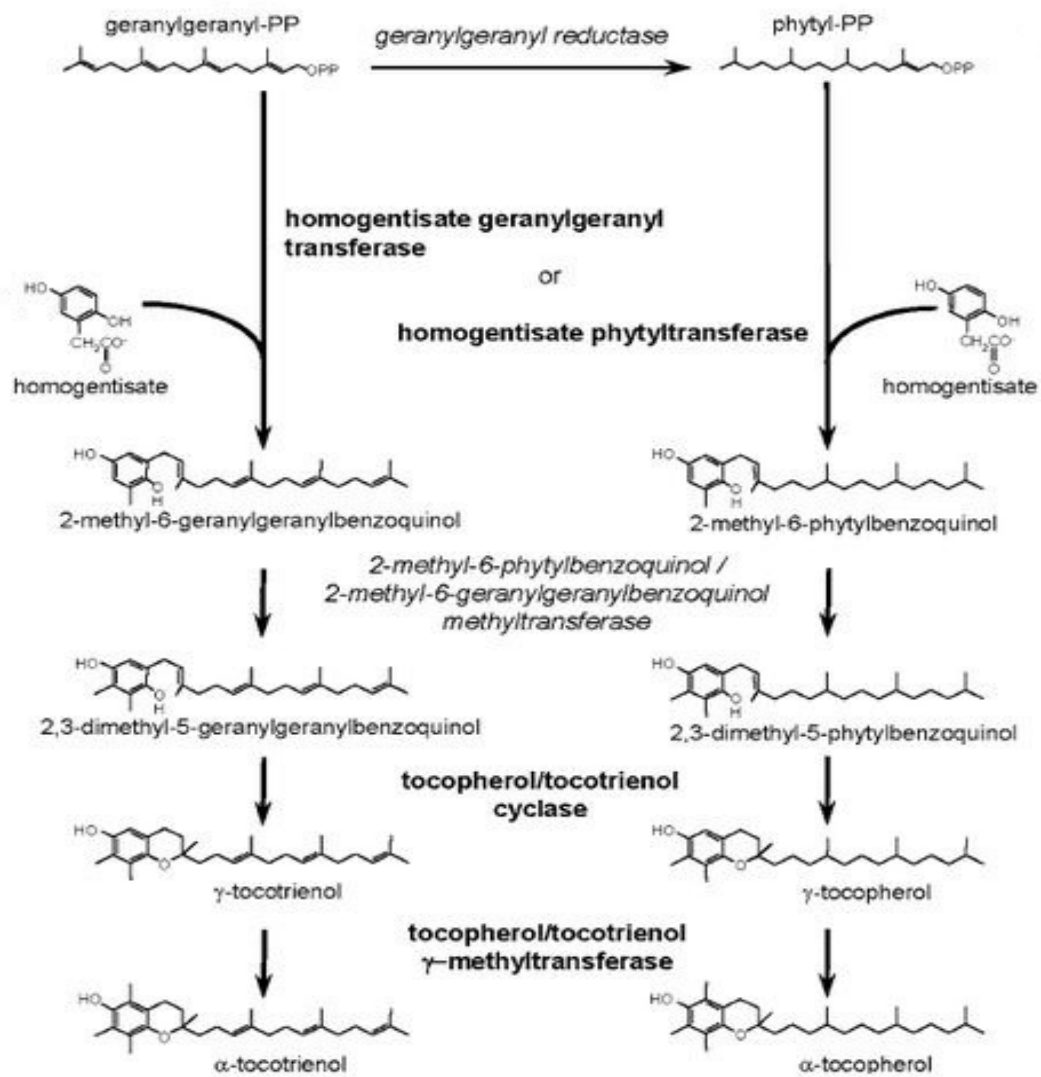
L'anello cromanolico e la catena a 16 atomi di carbonio che costituiscono i tococromanoli, derivano dall'HGA (*homogentisic acid*) e dal PrDP (*phytyl diphosphate*) dal GGDP (*geranylgeranyldiphosphate*), rispettivamente.

La condensazione di HGA e PrDP o GGDP, la reazione chiave della biosintesi dei tocoferoli, è catalizzata dall'enzima HPT (*HGA-phytyltransferase*) (Venkatesh *et al.*, 2006; Hunter *et al.*, 2007) e dall'HGGT (*HGA-geranylgeranyltransferase*) (Hunter *et al.*, 2007), rispettivamente (vedi oltre).

La via biosintetica della vitamina E è caratterizzata da due reazioni consequenziali e fondamentali che conducono alla formazione di un tococromanolo:

- la prenilazione dell'HGA;
- ciclizzazione dell'anello cromanolico.

In questi casi, la vitamina E potrà essere  $\delta$ -tocoferolo o  $\delta$ -tocotrienolo. Ulteriori passaggi di metilazione, infatti, producono le isoforme  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  della vitamina E.



**Fig. 5i:** Biosintesi di TPs e T3s (modificata da: Hunter *et al.*, 2007)

Due substrati sono richiesti per la sintesi della vitamina E: HGA e l PrDP o GGDP. Il GGDP può essere utilizzato direttamente e preferenzialmente per la sintesi di tocotrienoli o ridotto a PrDP per la sintesi di tocoferoli ad opera di una geranylgerani-reduttasi (Hunter *et al.*, 2007).

Oltre ai due costituenti principali appena descritti, i tococromanoli sono mono-, di- o tri- metilati. Lo schema di metilazione è fondamentale per la determinazione della biodisponibilità delle molecole e delle loro proprietà biologiche (cfr. prima).

La prima reazione consiste nel trasferimento del gruppo prenile all'HGA. Tale trasferimento, una condensazione e una decarbossilazione, avviene ad opera dell'enzima HPT o HGGT. La specificità del substrato e del relativo enzima che interviene determineranno la natura del tococromanol che sarà sintetizzato. Infatti, in base a che il substrato sia il GGDP o il PrDP, si avrà la formazione di 2-metil-6-geranylgeranylbenzochinolo o di 2-metil-6-fitylbenzochinolo, rispettivamente (Hunter *et al.*, 2007).

Per ottenere i  $\gamma$ - o  $\alpha$ -tococromanoli, è opportuno che l'anello benzochinolico subisca una metilazione in posizione 3. Ciò avviene nel corso della seconda

reazione, ad opera degli enzimi 2-metil-6-fetilbenzochinolo o 2-metil-6-geranilgeranilbenzochinolo metiltrasferasi con la formazione di 2,3- dimetil-5-geranilgeranilbenzochinolo o 2,3-dimetil-5-fetilbenzochinolo, rispettivamente. Tale passaggio viene omesso nella sintesi di  $\beta$ - e  $\delta$ -tococromanoli (Hunter *et al.*, 2007).

Un ulteriore enzima che interviene nella via biosintetica della vitamina E è la TC (*tocopherol/tocotrienol cyclase*). Nel corso di quella che è considerata la terza reazione, l'enzima catalizza la formazione del gruppo cromanolico in testa alle molecole, a partire dall'intermedio di benzochinolo, che può presentare un differente schema di metilazione, determinato nella reazione precedente.. Evidenze sperimentali confermano la capacità dell'enzima di usare come substrato gli intermedi sia mono- che di-metilati, oltre a non privilegiare le forme prenilate su quelle geranilgeranilate, e viceversa. Per cui ne deriva che i prodotti finali sono sia  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferolo che  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo.

A differenza degli altri enzimi di tale via biosintetica, la TC è localizzata all'interno dei plastoglobuli presenti nei cloroplasti (Vidi *et. al*, 2006), e non a livello delle membrane interne (cfr. prima).

L'enzima TMT (*tocopherol/tocotrienolo methyltransferase*) catalizza la reazione finale nella sintesi di  $\alpha$ - e  $\beta$ -tococromanoli: la metilazione del carbonio in posizione 5 sull'anello cromanolico. L'enzima ha attività su tutte le isoforme –  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferolo e  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo – derivanti dalle reazioni precedenti (Hunter *et al.*, 2007).

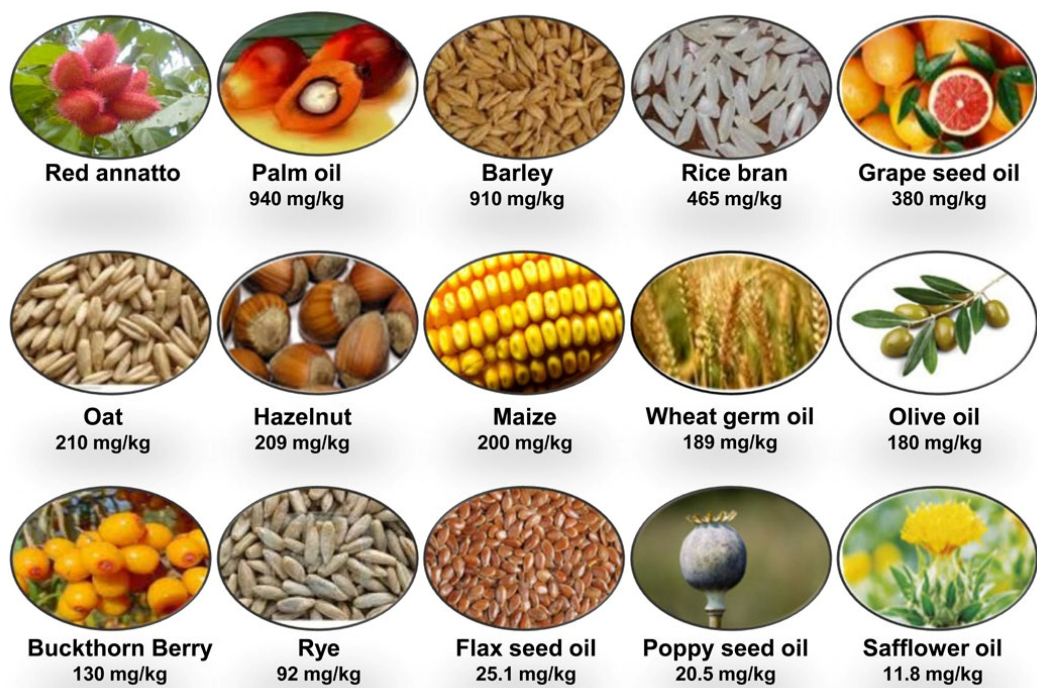
### **Fonti della vitamina E**

La vitamina E è sintetizzata esclusivamente da organismi fotosintetici.

I tocoferoli sono rinvenuti in alte concentrazioni in oli vegetali, grassi di origine animale, cereali, verdure e frutta (Combs, 1992).

I tocotrienoli sono la forma principale di vitamina E presente nell'endosperma dei semi della maggior parte di monocotiledoni, comprese alcune specie di cereali importanti dal punto di vista agronomico, come orzo, frumento e riso. Essi, inoltre, sono stati rinvenuti anche nell'endosperma di semi di un numero limitato di dicotiledoni, che includono specie di *Apiaceae* e alcune specie di *Solanaeaceae*, come la pianta di tabacco.

Tali molecole sono state ritrovate in maniera sporadica nei tessuti vegetativi delle piante, anche da quanto emerge dal confronto con i tocoferoli.



**Fig. 6i:** Principali fonti di tocotrienoli e relative concentrazioni (modificata da Aggarwal *et al.*, 2010).

Le palme da olio sono monocotiledoni appartenenti al genere *Elaeis*.

Il genere comprende due specie denominate *E. olifera*, originaria del Sud America, ed *E. guineensis* originaria dell'Africa occidentale. Attualmente, la più alta produzione di olio di palma è attribuita al Sud-Est asiatico, in particolare alla Malesia e all'Indonesia (Sundram *et al.*, 2003).

Tali alberi perenni sono tra le maggiori produttrici di olio, di cui i distinguono due tipologie, in base alla parte del frutto da cui sono estratti:

- olio derivante dall' endosperma, con ampia applicazione nell'industria chimica;
- olio derivante dal mesacarpo, prodotto edibile dell'industria alimentare.

L'olio crudo di palma estratto dal mesacarpo del frutto della specie *Elaeis guineensis* contiene un'elevata concentrazione di tocotrienoli (fino a 800 mg/kg), costituito principalmente da  $\gamma$ -tocotrienolo ed  $\alpha$ -tocotrienolo.

Comunemente a tutti gli oli, i principali costituenti dell'olio di palma sono i TGs (*triacylglycerols*). Essi rappresentano il 95% della composizione totale e sono presenti in una miscela di molecole di glicerolo esterificate con tre acidi grassi.



Durante l'estrazione dell'olio dal mesocarpo dei semi, i TGs attraggono altre componenti cellulari lipidici o, comunque, lipofili. Questi ultimi costituiscono l'insieme dei componenti minori dell'olio di palma, distinti essenzialmente in due gruppi:

- derivati degli acidi grassi, quali gliceridi parziali (*monoacylglycerols*, *diacylglycerols*), FFAs (*free fatty acids*), fosfatidi, esteri e steroli;
- composti chimicamente non correlati agli acidi grassi, quali idrocarburi, alcool alifatici, pigmenti, tocoferoli e metalli in tracce.

Le sostanze rinvenute sono essenzialmente come metaboliti della biosintesi dei triacilgliceroli e i prodotti dell'attività lipolitica.

I TGs contenuti nell'olio di palma ne definiscono parzialmente la maggior parte delle caratteristiche fisico-chimiche come la temperatura di fusione e profilo di cristallizzazione. La composizione di acidi grassi dell'olio di palma (con rapporto circa 1:1 tra saturi ed insaturi), molto differente da quella di qualsiasi altro grasso di origine vegetale o animale, ne determina la tipica consistenza semisolida alle normali temperature ambientali (Sundram *et al.*, 2003).

Per il suo alto contenuto di acidi grassi saturi o idrogenati, l'olio di palma non è divenuto molto popolare nell'alimentazione Occidentale rispetto a quanto avvenuto per quella Orientale e per gli stessi Paesi produttori.

I grassi idrogenati, infatti, hanno un elevato contenuto di acidi grassi *trans* a cui sono attribuiti effetti avversi sullo stato di salute<sup>2</sup>. La sentenza della US Food and Drug Administration del 2003 in materia di etichettatura degli acidi grassi liberi stabilisce la netta differenziazione tra le due tipologie sopra citate, stabilendo come un grasso, seppur idrogenato, non è necessariamente *trans*; per cui è obbligatorio indicare sull'etichetta dei vari alimenti la natura specifica dei grassi contenuti (Tarrago-Traini *et al.*, 2006).

L'olio di palma è, quindi, privo di acidi grassi *trans* e, per tale ragione, ha acquistato e continua ad ottenere una sempre più vasta approvazione in campo alimentare. Le principali applicazioni includono prodotti da forno, cereali per la colazione e dolci vari (Chandan *et al.*, 2007).

---

<sup>2</sup> Aumento del "colesterolo cattivo": le LDL sono le principali lipoproteine di trasporto del colesterolo nel plasma, fondamentali per il rifornimento delle cellule di tale importante costituente. Le LDL, però, sono facilmente deteriorabili dall'attacco di specie radicaliche che ne alterano la struttura. Esse tendono, quindi, ad agglomerarsi ed attecchire alle pareti dell'endotelio dei vasi, causandone l'ostruzione e conseguenziali problemi cardiovascolari (Sundram *et al.*, 2003).

L'olio di palma crudo assume una colorazione particolare rosso-aranciata, dovuta all'elevato contenuto di carotene (700-800 ppm), tra gli altri pigmenti.

La maggior parte dei carotenoidi contenuti sono le isoforme  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotene, in una percentuale di circa 90% (Sundram *et al.*, 2003).

Molto importanti dal punto di vista nutrizionale, i caroteni sono i precursori della vitamina A, ma altrettanto sensibili all'ossigeno, alla luce e al calore. Ne deriva che durante le fasi di raffinazione dell'olio di palma, le alte temperature distruggono le proprietà cromogene di tali molecole che conferiranno all'olio un caratteristico colore giallastro.

I tocoferoli si ritrovano in maniera ubiquitaria nei tessuti vegetali in quanto sono la forma esclusiva di vitamina E presente nelle piante e nei semi della maggioranza delle dicotiledoni.

La vitamina E è presente in vario grado nella maggior parte degli oli edibili come quello di germe di grano, di crusca di riso (0.035%), di orzo (0.012% o 44 mg/g di olio), di avena (0.03%) , di cocco (0.019%) e di palma (0.044%; 0.78-1.08 mg/g oil) (<http://www.tocotrienol.org>).

L'olio derivante dalla crusca di riso, un sottoprodotto della macinazione del riso, è un'importante fonte naturale di  $\gamma$ -tocotrienolo, ma scarsa di  $\alpha$ -tocotrienolo. Inoltre, in tale olio sono state rinvenute forme alternative di tocotrienoli, che si distinguono dalle note isoforme descritte per l'assenza dei specifici gruppi metilici (Qureshi *et al.*, 2000).

Sebbene le evidenze sperimentali restino relativamente limitate, olio di crusca di riso è considerato un prodotto alimentare salubre in Paesi Asiatici (Sugano *et al.*, 1999).

Le concentrazioni dei tocotrienoli in cereali come avena, segale ed orzo si rinvencono in maniera particolarmente ridotta. Il maggior rappresentante, inoltre, è l' $\alpha$ -T3 in avena ed orzo, dove si registrano valori pari 56 e 40 mg/kg di peso secco, rispettivamente (Chandan *et al.*, 2007).

Il  $\beta$ -T3 è la principale forma di tocotrienoli all'interno di farro corticato e decorticato (33-43 mg/kg di peso secco) (Panfili *et al.*, 2003).

La cottura a vapore e la desquamazione della semola di avena decorticata determinano la perdita moderata di tocotrienoli ma non di tocoferoli.

Anche se molti prodotti alimentari presentano un contenuto variabile di tocotrienoli, è opportuno determinare se tali fonti dietetiche sono in grado di fornire quantità sufficienti a trarne beneficio agli esseri umani.

In letteratura sono riportate opportune valutazioni derivanti dal confronto di più prodotti edibili che contengono tocotrienoli.

Approssimativamente si dovrebbero consumare 100-200g di olio di palma o di crusca di riso, oppure 1.5-4 kg di germe di grano, orzo o avena per ottenere le dosi di tocotrienoli biologicamente efficaci evidenziate dagli studi. Da qui deriva la necessaria ed efficace ideazione di opportuni integratori alimentari di tali sostanze, al fine di garantirne un opportuno dosaggio di somministrazione.

Tra le fonti naturali di tocotrienoli non vanno tralasciati i prodotti vegetali non edibili, come il lattice di gomma (Chow e Draper 1970; Horvath *et al.*, 2006; Whittle *et al.*, 1966).

### **Metabolismo e assorbimento della vitamina E**

I benefici derivanti dall'assunzione di tococromanoli, quali rafforzamento dello stato di salute o nel miglioramento di stati patologici, sono associati ad un assorbimento ottimale dei composti dal tratto intestinale nel circolo ematico. Un compromesso od alterato assorbimento si traduce, inevitabilmente, in una scarsa biodisponibilità degli stessi composti, dai quali i consumatori non saranno in grado di beneficiare delle suddette proprietà.

Le sostanze lipidiche sono traghettate nella circolazione ematica in apposite micelle, dopo l'assorbimento attraverso la parete intestinale, che ne permettono la solubilità in mezzi acquosi come il plasma.

Le micelle sono presenti esclusivamente quando si verifica l'azione di lipasi e sali biliari.

La bile agevola l'emulsione delle sostanze lipidiche presenti negli alimenti in fase di digestione, altrimenti insolubili e non assorbibili, in modo che essi, disciolti, siano distribuiti su più ampie superfici e ne sia promosso l'assorbimento intestinale e l'immissione in circolo.

L'ammontare delle secrezioni biliari e delle lipasi sono determinanti per l'assorbimento dei lipidi. Per un'adeguata secrezione, infatti, deve essere quantitativamente sufficiente l'assunzione di grassi con la dieta.

Come le altre vitamine liposolubili (A, D, K), l'assorbimento dei tococromanoli non sarà possibile o, comunque, completo senza la presenza di altri grassi alimentari, come durante l'assunzione degli stessi che avvengono a digiuno.

I meccanismi dell'assorbimento e del metabolismo della vitamina E restano essenzialmente ancora poco descritti.

Gli esigui dati riguardano prevalentemente l'assorbimento dei tocoferoli, mentre i corrispettivi *pathways* per i tocotrienoli rimangono relativamente poco noti nell'Uomo e negli animali da esperimento.

Evidenze sperimentali suggeriscono un'elevata analogia tra il metabolismo di tocoferoli e tocotrienoli (Birringer *et al.*, 2002).

Dopo l'ingestione è noto, come precedentemente accennato, che le differenti molecole di tococromanoli vengono emulsionate all'interno di micelle miste che si formano dalla combinazione dei sali biliari con i prodotti dell'idrolisi dei lipidi di

origine alimentare, assorbite dalla mucosa intestinale, attraverso un meccanismo di diffusione passiva.

Gli esteri del tocoferolo sono le forme maggiormente presenti negli alimenti ingeriti. Attraverso l'apparato digerente tali forme non subiscono modificazioni significative, fino ad arrivare all'intestino dove, per poter essere emulsionate, caricate nelle micelle e, quindi, assorbite, è necessario che subiscano un'idrolisi specifica operata da opportune esterasi pancreatiche (Bramley *et al.*, 2000).

I TP e T3, dopo essere stati assorbiti dagli enterociti, insieme agli altri prodotti lipidici della digestione, vengono incorporati nei chilomicroni, passando dall'intestino al circolo linfatico e, infine, nella circolazione sistemica (Bramley *et al.*, 2000).

Nel circolo ematico, i triacilgliceroli che costituiscono i chilomicroni subiscono l'idrolisi delle LPL<sup>3</sup> (*lipoprotein lipase*), fino a costituire i chilomicroni *remnants*, impoveriti cioè del loro contenuto lipidico. Questi arrivano, quindi, al

---

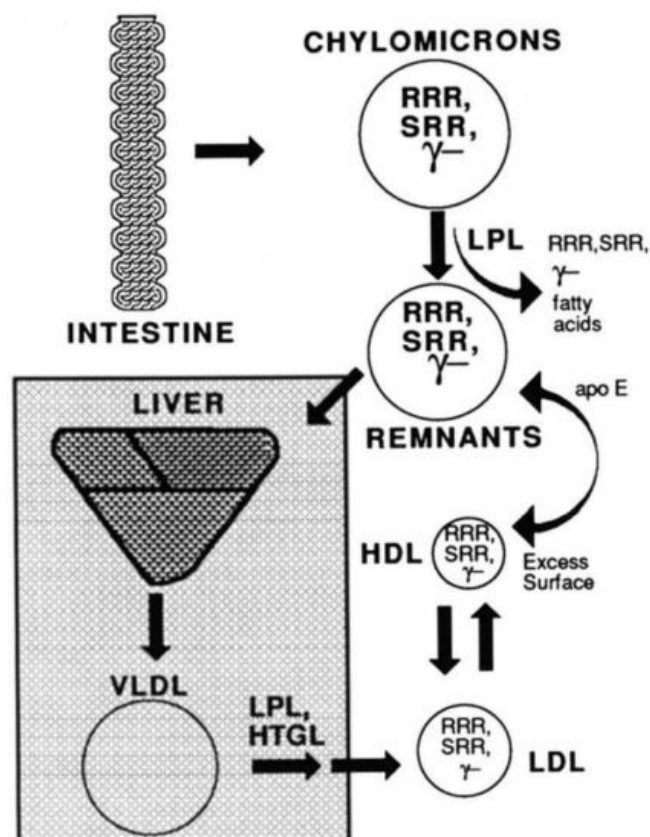
<sup>3</sup> Le lipasi lipoproteiche sono enzimi localizzati sul versante extracitoplasmatico delle membrane plasmatiche delle cellule. La funzione delle LPL è quella di idrolizzare i trigliceridi provenienti dalle lipoproteine e di produrre acidi grassi e glicerolo, che avranno accesso alla cellula e saranno ossidati per la produzione di energia immediata o risintetizzati in trigliceridi per costituire energia di riserva.



fegato, dove saranno incorporati e liberati del loro carico di tococromanoli (Traber *et al.*, 1990).

Nel fegato, le molecole saranno caricate nelle lipoproteine di trasporto, per poter essere traggiate nel torrente circolatorio.

I meccanismi di carico delle molecole attive nelle lipoproteine di trasporto sono altamente selettivi e sono preferenziali per l' $\alpha$ -TP. A livello epatico, infatti, è stata determinata la presenza della  $\alpha$ -TTP ( *$\alpha$ -tocopherol transfer protein*), uno specifico trasportatore citosolico di 32 kDa (Traber *et al.*, 1990; Arita *et al.*, 1997).



**Fig. 7i:** Processo di catabolismo ed assorbimento dei derivati dei tococromanoli. I tococromanoli, dopo essere stati assorbiti dagli enterociti e incorporati nei chilomicroni, passano dall'intestino al circolo linfatico e infine alla circolazione sistemica. I chilomicroni *remnants* arrivano, quindi, al fegato, da dove ripartono per lo smistamento agli organi bersaglio, attraverso il circolo. **RRR**, **SRR** indicano le configurazioni degli atomi chirali nelle molecole di tococromanoli (modificata da Kayden e Traber, 1993).

Il trasporto delle varie isoforme della vitamina E nel plasma avviene grazie alle LDL (*low density lipoprotein*), alle quali sono associate maggiormente, ma talvolta alle VLDL (*very low density lipoprotein*) e HDL (*high density lipoprotein*).

I T3 sono stati rivelati nei campioni di plasma – prelevati da volontari in fasi postprandiali – in concentrazioni significativamente inferiori all' $\alpha$ -tocoferolo. Tale risultato coincide con precedenti osservazioni che evidenziano l'assenza di tocotrienoli nel plasma in condizioni di digiuno, confermando che l'assorbimento e il trasporto di tocotrienoli segue vie biochimiche che coinvolgono un gran numero di lipoproteine (cfr. prima) opportunamente attivate dal consumo di altre sostanze lipidiche nell'alimentazione (Fairus *et al.*, 2006).

Ulteriori studi dimostrano che tra gli isomeri dei T3, l' $\alpha$ -tocotrienolo è l'isoforma maggiormente trasportata dalle lipoproteine e che presenta le più alte concentrazioni plasmatiche postprandiali in volontari a cui erano state somministrate diete con supplemento di vitamina E, ricca nella componente tocotrienolica (Fairus *et al.*, 2012).

Il metabolismo del tocoferolo è complessivamente molto lento. I prodotti di tale metabolismo sono eliminati con le feci, sotto forma di  $\alpha$ -tocoferilidrochinone e  $\alpha$ -tocoidrochinone, e nelle urine come acido tocoferonico, tutti composti che vengono coniugati con acido glucuronico.

### **Attività biologiche di tocoferoli e tocotrienoli**

La vitamina E è tra le più importanti molecole antiossidanti e sembra essere coinvolta in numerose funzioni biologiche e fisiologiche.

Tocoferoli e tocotrienoli esplicano le proprie attività attraverso meccanismi che prevedono il legame diretto degli stessi con i loro *targets* molecolari, o senza (Aggarwal *et al.*, 2010). La modulazione può avvenire a livello trascrizionale, traduzionale o post-traduzionale.

Tra i principali meccanismi molecolari vi è la capacità di stabilizzare le membrane biologiche (Wang *et al.*, 1999), con le quali si lega e ne regola la permeabilità (Burton *et al.*, 1982).

EFFETTI ANTIOSSIDANTI. L'attività antiossidante si esplica a carico dei PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) grazie alla natura lipofila della molecola, responsabile della localizzazione e dell'accumulo a livello degli organelli e delle membrane cellulari.

Ritenuto già che l' $\alpha$ -TP fosse indispensabile per tutti gli organismi che consumano ossigeno – per la respirazione cellulare – Burton ed Ingold nel 1989 proposero che l'attività dello stesso fosse fondamentalmente antiossidante, data la sua capacità di agire come *scavenger* (“spazzino”) di radicali liberi, interrompendo la catena di reazioni innescate dalle specie radicaliche o in generale da specie reattive dell'ossigeno (ROS) o dell'azoto (RNS). Il suo ruolo, dunque, si esplica nella prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, evento chiave nello sviluppo del processo di perossidazione lipidica.

I radicali liberi reagiscono con i doppi legami dei lipidi di membrana generando dei perossidi lipidici che, essendo a loro volta reattivi, propagano le reazioni di ossidazione determinando un danno esteso alle membrane (Herrera e Barbas, 2001).

La vitamina E, come tutti i composti fenolici, spezza il propagarsi del fenomeno donando un atomo di idrogeno – del gruppo –OH – ai radicali perossilipidici, rendendoli in tal modo non reattivi. La reazione redox così avvenuta, produce il radicale  $\alpha$ -tocoferossilico, piuttosto stabile per la

delocalizzazione dell'elettrone, e può rigenerare l' $\alpha$ -tocoferolo reagendo con vitamina C, o glutatione, o coenzima Q10 (Wang e Quinn, 1999).

L'efficienza della Vitamina E e dei fenoli, come antiossidanti è anche dovuta al fatto che il radicale fenossile, che si forma durante il processo di inibizione, intrappola un secondo perossiradicale in una veloce reazione di accoppiamento.

Rispetto ai tocoferoli, i tocotrienoli risultano 40-60 volte più efficaci nella prevenzione della perossidazione lipidica. L'inibizione di questo processo da parte dei tocotrienoli è riconducibile ad una maggiore efficienza del riciclo del radicale cromanilico e ad una migliore interazione con i costituenti della membrana cellulare; la tripla insaturazione della catena isoprenoide, infatti, conferisce ai tocotrienoli una maggiore affinità e una più rapida interazione con i bio-costituenti del doppio strato fosfolipidico di membrana. Per queste ragioni i tocotrienoli presentano una maggiore biodisponibilità ed un incremento dell'accumulo intracellulare. In particolare, il  $\delta$ -tocotrienolo è, tra le diverse isoforme, fisiologicamente più attivo poiché, rispetto agli altri isomeri, possiede una maggiore efficienza di neutralizzazione delle specie radicaliche dovuta al

minor numero di gruppi metilici legati all'anello cromanilico.

EFFETTI CARDIOPROTETTIVI. L'attività antiossidante dei tocotrienoli, per molto tempo considerata

inferiore rispetto a quella dei tocoferoli, è veicolata dall'induzione di enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (Lee et al., 2009; Newaz e Nawal, 1999), NADPH:chinone ossidoriduttasi (Hsieh e Wu, 2008), glutathione perossidasi (Adam et al., 1996), che spazzano via le forme radicaliche (Renuka Devi e Arumughan, 2007).

Esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che i tocotrienoli possono indurre un miglioramento del quadro clinico dell'arterosclerosi e possono, soprattutto, prevenire la genesi del fenomeno arterosclerotico (Black et al., 2000). Ne deriva il loro probabile utilizzo come coadiuvanti nella terapia e nella profilassi di malattie cardiovascolari e dell'infarto al miocardio (Bierenbaum et al., 1995). Tale azione, tipica dei tocotrienoli ma non esibita dai tocoferoli, si esplica a livello cellulare ed è dovuta alla riduzione della produzione delle molecole responsabili dell'adesione



cellulare, attraverso l'inibizione dell'attività della proteina chinasi C. (Theriault et al., 2000; 2002).

L'attività protettiva nelle patologie cardiovascolari dei T3s è supportata dall'abbassamento dei livelli plasmatici di due proteine riconosciute come principali fattori di rischio delle suddette patologie: l'apolipoproteina B e la lipoproteina A. Inoltre, evidenze sperimentali dimostrano che i tocotrienoli abbassano i livelli di trombossano B2, un potente induttore dell'aggregazione piastrinica (Qureshi et al., 1991), nonché uno dei principali fattori predisponenti allo sviluppo delle patologie coronariche.

Le malattie coronariche sono spesso associate ad un aumento dei livelli plasmatici di colesterolo totale, ed in particolare delle LDL. I tocotrienoli agiscono anche a livello della colesterologenesi, inducendo un abbassamento dei livelli totali di LDL (Qureshi et al., 1995; Qureshi et al., 2001a) e mediando l'inibizione dell'enzima HMG-CoA riduttasi, impegnato in una delle reazioni chiave della sintesi del colesterolo (Pearce et al., 1992; Parker *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1994; Chao *et al.*, 2002). Inoltre, essi favoriscono l'aumento dei livelli intracellulari di farnesolo, molecola responsabile dell'attivazione della

degradazione proteolitica dell'enzima epatico idrossi-metilglutaril CoA reduttasi, che catalizza la reazione limitante della catena biosintetica (Qureshi *et al.*, 1996). Infatti, studi recenti dimostrano che un'integrazione nella dieta di 200 mg/die di fito-tocotrienoli per 6 settimane, abbassa il colesterolo totale del 20%, il colesterolo LDL del 28% e l'apolipoproteina del 18% (Qureshi *et al.*, 2001b). Alla luce di questi dati, si può ipotizzare che i fito-tocotrienoli potrebbero essere efficacemente impiegati nel trattamento dell'ipercolesterolemia, in associazione al trattamento farmacologico tradizionale con altri farmaci, ipotesi avvalorata dalla assenza di effetti collaterali ad opera di tali molecole.

La persistente ipertensione arteriosa è una delle cause principali degli scompensi cardiaci e dell'infarto, oltre ad essere il fattore primario che porta all'insufficienza renale cronica. In uno studio è stato dimostrato il ruolo dei tocotrienoli nella riduzione della pressione sistolica in ratti ipertesi, attività che appariva ben più evidente e pronunciata dal confronto con l' $\alpha$ -TP (Koba *et al.*, 1992).

I tocotrienoli hanno dimostrato di avere un importante ruolo nella protezione del muscolo cardiaco da danno ischemico. Essi, infatti, regolano il

pathway di segnalazione dell'ossido nitrico-cGMP, che risulta compromesso durante i fenomeni ischemici. Esterhuysen et al. (2005) dimostrano il globale miglioramento delle conseguenze dell'ischemia in cuore di ratto, come l'aumento dei livelli del cGMP e la variazione della composizione dei PUFA dopo il trattamento con olio di palma (ricco in T3).

Tra le varie isoforme di tocotrienoli, il  $\gamma$ -T3 è quello che dimostra la maggiore attività cardioprotettiva quando somministrato singolarmente e in associazione con altri agenti antiossidanti (ad esempio il resveratrolo) (Lekli et al., 2009).

EFFETTI IMMUNOMODULATORI. Wu *et al.* (2008) hanno studiato gli effetti del TRF nei monociti umani della linea THP-1 in seguito alla risposta infiammatoria indotta dal LPS (*lipopolysaccharide*). Gli studi hanno riguardato la valutazione della produzione di diversi mediatori dell'infiammazione, quali NO, alcune citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-8, dell'attività di alcuni enzimi quali iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), COX-1 e COX-2 (cyclooxygenase-1 e cyclooxygenase-2) e del fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B

(*nuclear factor  $\kappa$ B*). In particolare è stato dimostrato che alle concentrazioni di 0,5-5  $\mu\text{g/mL}$  il TRF è in grado di proteggere la cellula dalla morte indotta dal lipopolisaccaride batterico. A tali concentrazioni il TRF ha una potente attività anti-infiammatoria, come dimostrato dall'inibizione del rilascio di NO, dalla diminuzione della trascrizione di geni codificanti per citochine pro-infiammatorie e, quindi, in generale dall'inibizione di tutti quei meccanismi pro-infiammatori indotti dal LPS. A concentrazioni di TRF pari a 1  $\mu\text{g/mL}$  si ha un blocco significativo dell'attività di iNOS e COX-2, ma non COX-1 che ha uno schema di attivazione costitutivo. Sulla base di queste osservazioni, gli autori hanno concluso che il TRF possiede una potente attività anti-infiammatoria che deriva dall'inibizione dell'attività e dell'espressione di iNOS, COX-2 e di altri fattori pro-infiammatori (Wu *et al.*, 2008).

Gu *et al.* (1999) hanno dimostrato gli effetti modulatori di una dieta ricca di  $\alpha$ -TP e una miscela di tocotrienoli sia sull'immunità umorale che cellulo-mediata. I loro risultati evidenziano che tali schemi alimentari potenziavano l'espressione IFN- $\gamma$  (*interferon- $\gamma$* ), IgA e IgG, ma non delle IgE, e diminuivano la proporzione delle cellule T CD4<sup>+</sup>. Inoltre, i tocotrienoli diminuiscono l'espressione del TNF- $\alpha$

(*tumor necrosis factor- $\alpha$* ). Queste indagini confermano che la somministrazione orale di tococromanoli influisce sulla proliferazione e la funzionalità dei linfociti splenici e dei linfonodi mesenterici.

EFFETTI NEUROPROTETTIVI. Le specie reattive dell'ossigeno, i radicali liberi e, più in generale, molti eventi ossidativi sono alla base di importanti disturbi a carico del sistema nervoso, tra cui il morbo di Alzheimer e quello di Parkinson.

Data la loro natura antiossidante, i tococromanoli, ed in particolare i T3, hanno importanti ruoli nella prevenzione di danni a livello neuronale in questo tipo di patologie (Bramley *et al.*, 2000).

Numerosi studi riportano che i tocotrienoli mostrano effetti neuroprotettivi in un'ampia varietà di condizioni. Chopra ed il suo gruppo di lavoro hanno evidenziato tale caratteristica dei tocotrienoli in modelli (ratti) sperimentali di neuropatia indotta da diabete (Kuhad *et al.*, 2009), neuropatia alcolica (Tiwari *et al.*, 2009b), disfunzioni cognitive indotte dall'alcool (Tiwari *et al.*, 2009c), deterioramento cognitivo farmacologicamente indotto, stress da ROS e NOS (Tiwari *et al.*, 2009a), tutte condizioni associate alla soppressione dei *pathways*

pro-infiammatori.

Sen e collaboratori, invece, hanno ampiamente analizzato la prevenzione della neurodegenerazione – indotta dal glutammato – operata dai tocotrienoli. Tale attività si verifica attraverso la modulazione della chinasi c-SRC, della 12-lipossigenasi e al PLA2 (*phospholipase A2*) (Sen *et al.*, 2000; Khanna *et al.*, 2003; Khanna *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2007; Khanna *et al.*, 2010).

L'ictus è una forma di danno ischemico a carico del cervello causato dalla riduzione dell'apporto di sangue all'organo (Aggarwal *et al.*, 2011).

L' $\alpha$ -T3, insieme all' $\alpha$ -TP e  $\gamma$ -TP, riduce significativamente l'estensione dell'infarto cerebrale in organismi modello (topi) con l'occlusione dell'arteria cerebrale mediana, mentre le altre isoforme di tococromanolli non mostrano effetti (Mishima *et al.*, 2003).

EFFETTI SUL METABOLISMO OSSEO. Il fumo di sigaretta è considerato un fattore di rischio per lo sviluppo dell'osteoporosi.

I supplementi alimentari di vitamina E riducono la perdita di tessuto osseo indotta da nicotina e stimolano la formazione dello stesso (Hermizi *et al.*, 2009).

Esperimenti condotti su organismi modello (ratti), a cui erano somministrati TRF o  $\gamma$ -T3 (60 mg/kg) in seguito a trattamento con nicotina, dimostrano un aumento dello spessore delle trabecole e una riduzione dell'erosione delle superfici ossee negli animali sottoposti a trattamento rispetto ai controlli. La vitamina E si mostra, quindi, come un agente anabolico (Shuid *et al.*, 2010).

L'azione protettiva a carico del sistema scheletrico dimostrata dai tocotrienoli si esplica grazie alla loro natura antiossidante contro radicali liberi e glucocorticoidi (Ima-Nirwana e Suhaniza, 2004).

EFFETTI GASTROPROTETTIVI. In letteratura sono disponibili anche alcune evidenze che suggeriscono effetti gastro-protettivi della vitamina E.

Azlina e collaboratori hanno valutato la capacità di tocoferoli e tocotrienoli di attuare meccanismi atti a svolgere una funzione gastro-protettiva in presenza di fattori di stress. Scelti come organismi modello ratti maschi *Sprague-Dawley*, sono stati formati 3 gruppi oggetti di studio:

1. un gruppo di controllo sottoposto ad una dieta completa;
2. un gruppo a cui era somministrata una dieta carente in vitamine ma

arricchita in tocoferoli (60 mg/kg);

3. un gruppo sottoposto ad un regime alimentare carente di vitamine ma con supplemento di tocotrienoli (60 mg/kg).

La metà dei ratti, derivanti dai 3 gruppi sopra descritti, non sono stati sottoposti a stress per un periodo di 28 giorni mentre l'altra metà ha ricevuto uno stress da isolamento e deprivazione da cibo per 2h/giorno per 4 giorni.

I dati hanno mostrato che nei ratti non stressati (sia nei controlli che nei ratti trattati con tocoferoli) la concentrazione di acidi gastrici e i livelli di gastrina nel siero erano diminuiti. Nei ratti trattati con tocotrienoli (sia le metà sottoposta a stress che quella non sottoposta a stress) i livelli di gastrina nel siero e di acidi gastrici sono paragonabili. In base a questo studio appare plausibile che i tocotrienoli sono in grado di preservare i livelli di acidità gastrica e di gastrina alterati da situazioni di stress. Un altro dato emerso nel medesimo studio conferma che sia i tocotrienoli che i tocoferoli, per la loro natura antiossidante, hanno un effetto gastroprotettivo contro i danni causati dai radicali liberi, prodotti proprio in condizioni di stress (Azlina et al., 2005).



EFFETTI IPOGLICEMIZZANTI. Il diabete mellito è una sindrome complessa caratterizzata da un'assoluta deficienza di insulina o una resistenza ad essa che porta ad uno stato definito di iperglicemia, quale risultato di un inadeguato trasporto del glucosio dal circolo ematico al tessuto muscolare ed adiposo (Pickup e Williams, 1997).

Sono state descritte due forme distinte di diabete mellito:

- tipo 1: le cellule- $\beta$  pancreatiche, che producono l'insulina, sono distrutte da meccanismi autoimmunitari mediati dai linfociti T, con conseguenziale riduzione nella produzione dell'ormone (Rossini et al., 1985);
- tipo 2: causato da insulino-resistenza e/o una ridotta produzione dell'ormone da parte del pancreas, solitamente connesso all'obesità (Kahn e Flier, 2000; Kahn, 2001).

Nonostante i differenti meccanismi eziopatogenetici, il diabete di tipo 1 e 2 condividono alcuni aspetti quali l'intolleranza al glucosio, iperglicemia, iperlipidemia.

Fang e collaborato i hanno individuato i meccanismi attraverso i quali i tocotrienoli sono in grado di ridurre i livelli di glucosio nel sangue sia in pazienti che in modelli animali (Fang *et al.*, 2010). Le ipotesi propongono che i tocotrienoli modulano i recettori nucleari PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Essi sono specifici fattori di trascrizione che, in seguito al legame con i propri ligandi, traslocano nel nucleo dove riconoscono sequenze di consenso specifiche, denominate PPREs (*Peroxisome Proliferator Response Elements*). Questi sono localizzati nei promotori di geni specifici che intervengono nell'omeostasi lipidica, nell'adipogenesi, nelle risposte adattative alla fatica e allo stress, nonché nel controllo delle risposte ormonali ed infiammatorie. Le forme di  $\alpha$ - e  $\gamma$ -T3 attivano PPAR- $\alpha$ , mentre il  $\delta$ -T3 attiva le forme PPAR- $\alpha$ , - $\delta$ , - $\gamma$ . Inoltre, è stato osservato che l'arricchimento in TRF delle diete di topi db/db, geneticamente predisposti al diabete, è associato all'aumento dell'utilizzo di glucosio e alla sensibilità all'insulina (Fang *et al.*, 2010).

Molte evidenze sperimentali suggeriscono che l'apoptosi sia il meccanismo di morte privilegiato dalle cellule- $\beta$  del pancreas in entrambe le manifestazioni patologiche (Kurrer *et al.*, 1997; Mathis *et al.*, 2001; Eizirik *et al.*, 2001; Butler *et*

*al.*, 2003). Inoltre, studi più recenti, attribuiscono al reticolo endoplasmatico un ruolo nella patogenesi del diabete sia dal punto di vista immunitario che dell'insulino-resistenza (Araki *et al.*, 2003), nonché nella trasduzione dei segnali di morte per apoptosi nelle cellule- $\beta$  del pancreas (Scheuner e Kaufman, 2008; Eizirik *et al.*, 2008).

EFFETTI ANTITUMORALI. Numerosi studi hanno evidenziato che i T3s possono indurre apoptosi nel carcinoma epiteliale attraverso la depolarizzazione della membrana mitocondriale e il conseguente rilascio di citocromo C e attivazione della cascata caspatica (Inoue *et al.*, 2011). Altre ricerche hanno invece messo in evidenza l'effetto antiproliferativo esercitato dagli stessi tocotrienoli, attraverso la degradazione della ciclina D (Wada, 2009) e il blocco del ciclo cellulare.

I T3s mostrano tuttavia diverse proprietà anti-tumorali, che spesso non sono esibite dai TP (Sen *et al.*, 2006), come la soppressione della crescita e l'induzione di apoptosi in differenti linee cellulari di cancro mammario, umane e murine (Nesaretnam *et al.*, 1995; Guthrie *et al.*, 1997; Nesaretnam *et al.*, 1998;

Yu *et al.*, 1999; McIntyre *et al.*, 2000; Nesaretnam *et al.*, 2000; Azzi *et al.*, 2001; Kline *et al.*, 2001; Schwenke, 2002; Sylvester *et al.*, 2002 ; Shah *et al.*, 2003; Sylvester and Shah, 2005a,b) e in altre linee cellulari umane (Ngah *et al.*, 1991; He *et al.*, 1997; Conte *et al.*, 2004; Nesaretnam *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2005; Eitsuka *et al.*, 2006; Srivastava and Gupta, 2006). È stato evidenziato che il trattamento combinato di tocotrienoli con altri agenti chemioterapici tradizionali determina una risposta sinergica anticancro. (Sylvester *et al.*, 2010).

L'azione antitumorale dei tocotrienoli, si manifesta anche attraverso la riduzione della disseminazione neoplastica: diversi lavori rilevano, infatti, la potenzialità di tali sostanze, di arrestare il processo metastatico (Shklar *et al.* 1996; Tang *et al.* 2001; Neuzil *et al.*, 2002; Inokuchi *et al.*, 2003; Miyazawa *et al.*, 2004).

Studi recenti dimostrano che i tocotrienoli inducono apoptosi in cellule leucemiche umane, e il  $\delta$ -T3 è l'isoforma più potente. Dati ultrastrutturali, infatti, confermano che essi inducono i classici cambiamenti morfologici tipici dell'apoptosi, come picnosi nucleare e condensazione cromatinica (Wong *et al.*, 2012)

I meccanismi molecolari alla base dell'attività dei T3s sono ancora scarsamente compresi ma, studi recenti condotti su linee cellulari di cancro mammario (MCF-7 e MDA), evidenziano un coinvolgimento del recettore per l'estrogeno  $\beta$  (ER- $\beta$ ), ma non di ER- $\alpha$ . (Comitato *et al.*, 2009; Comitato *et al.*, 2010). Inoltre, ulteriori studi condotti sulle medesime linee cellulari, e sulle HeLa (cancro uterino), in collaborazione con l'ex Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (non pubblicati), attuale C.R.A-NUT, dimostrano che il processo apoptotico indotto dal  $\gamma$ - e  $\delta$ -T3 non è associato a stress mitocondriale o alla trasduzione mediata da segnali che arrivano ai recettori di morte, ma a causa dello stress avvenuto a carico del reticolo endoplasmatico, attraverso l'attivazione di *chop* e il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$ . Questi studi preliminari sembrano essere confermati da Wali e collaboratori (Wali *et al.*, 2009), i quali hanno dimostrato che  $\gamma$ -T3 induce apoptosi nella linea cellulare +SA di tumore mammario umano, attraverso la risposta a stress del reticolo. Questo effetto è abolito con l'eliminazione dell'espressione del gene *chop*, dimostrandone la diretta dipendenza.

Una sostanza naturale può essere definita un agente chemioprotettivo se sono dimostrate le sue capacità di distruggere unicamente le cellule neoplastiche,

inibendo il ciclo cellulare o inducendo la morte cellulare programmata, non coinvolgendo le cellule sane (Srivastava e Gupta, 2006).

Alcuni studi condotti su diverse linee cellulari tumorali, ed in particolare su cellule ottenute da carcinoma mammario umano, hanno evidenziato che i tocotrienoli presentano un'attività antiproliferativa (Nesaretnam *et al.*, 1998).

Con l'obiettivo di comprendere i meccanismi molecolari alla base di osservazioni epidemiologiche che indicano un'associazione negativa tra consumo di tocotrienoli e tumore della mammella, l'ex Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, attuale C.R.A.-NUT, in collaborazione con il "Palm Oil Board of Malaysia", ha condotto uno studio su cellule di cancro mammario MCF-7, in cui venivano inoculate sotto il derma di topi nudi atimici, caratterizzati da un sistema immunitario compromesso, scelti come organismo modello. Ai topi veniva somministrata, per un periodo di 20 settimane, una dose orale di 1 mg/giorno di TRF. Al termine del trattamento è stato osservato un significativo rallentamento nella comparsa e nella crescita della massa tumorale (Nesaretnam *et al.*, 2004a).

Ulteriori studi successivi del medesimo gruppo (Nesaretnam et al., 2004b) hanno avuto come obiettivo la valutazione dell'espressione di geni sia in cellule di cancro mammario caratterizzate dalla presenza del recettore degli estrogeni (MCF-7), sia in cellule di cancro mammario la cui crescita è indipendente dalla presenza di estradiolo (MDA-MB-231). Tali cellule sono state trattate con 8 µg/ml di TRF per 72 ore e i risultati ottenuti hanno mostrato che il TRF induce una serie di effetti molecolari nelle due linee cellulari utilizzate. E' stato osservato che, a seconda della linea utilizzata, vengono modulati differenti geni (21 nelle MCF-7 e 46 nelle MDA-MB-231) e che, in entrambe le linee cellulari, vengono modulati, in egual misura, solo 3 geni i cui prodotti proteici sono coinvolti nel ciclo cellulare e possono svolgere un effetto inibitorio sulla proliferazione tumorale. Tali geni sono:

- *c-myc binding protein* MM-1;
- *23k-Da highly basic protein*;
- *interferon- inducible protein* 9-27 (Nesaretnam et al., 2004a).

Successivamente nello stesso Istituto, sono stati condotti altri studi atti a valutare la presenza di un meccanismo responsabile per le attività modulatorie

dei tocotrienoli e dipendenti dal recettore degli estrogeni. Infatti, a seguito di studi condotti *in silico*, confermati anche dalle analisi *in vitro*, è stato osservato un'interazione tra le forme  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo ed il recettore  $\beta$  (ma non  $\alpha$ ) degli estrogeni. Il complesso recettore/tocotrienolo così attivato, può traslocare nel nucleo e indurre l'espressione dei geni *mic-1*, *egr-1* e *cathepsin-D* che contengono una sequenza responsiva denominata ERE (*estrogen responsive element*) nel proprio promotore (Comitato *et al.*, 2009).

Gli estrogeni sono ormoni steroidei che, oltre a regolare la funzione riproduttiva, hanno anche un'azione morfogenica. Tale attività è evidente in strutture quali l'utero, le ovaie, le ghiandole mammarie, la prostata, i polmoni e il sistema nervoso centrale di topi *knockout* per entrambi i recettori degli estrogeni ER- $\alpha$  ed ER- $\beta$ . A livello di promotori genici i due recettori ER- $\alpha$  ed ER- $\beta$  hanno effetti opposti e quindi la risposta proliferativa al naturale ligando endogeno, l'estradiolo, è il risultato di un equilibrio tra i segnali relativi all'attivazione del recettore ER- $\alpha$  e del recettore ER- $\beta$ . ER- $\beta$  agisce come un regolatore negativo e quando è co-espresso con ER- $\alpha$ , gli effetti di quest'ultimo vengono repressi, inclusa la capacità di indurre la proliferazione cellulare (Ogawa *et al.*, 1998).



Il sottotipo  $\beta$ - del recettore degli estrogeni, quando è co-espresso con la forma  $\alpha$ -, è in grado di far spostare l'equilibrio verso la forma  $\beta$ -, e proprio questo *switch* funzionale (cioè questo disequilibrio tra la forma  $\alpha$ - e la forma  $\beta$ -, a favore di quest'ultima) è responsabile della riduzione della tumorigenicità nelle MCF-7 (Chang et al., 2006). Con tali presupposti, negli studi condotti successivamente nel già citato C.R.A.-NUT (ex INRAN), le cellule MCF-7 sono state trattate con i tocotrienoli (8  $\mu\text{g/mL}$  di TRF; 2.56  $\mu\text{g/mL}$  di  $\alpha$ -tocoferolo; 2  $\mu\text{g/mL}$  di  $\delta$ -tocotrienolo; 2.32  $\mu\text{g/mL}$  di  $\gamma$ -tocotrienolo) per 24 ore. È stata osservato un trasferimento del recettore ER- $\beta$  nel nucleo. Al contrario, il recettore ER- $\alpha$ , che normalmente è localizzato nel nucleo, non era più ivi rinvenibile. In seguito a questa attivazione delle MCF-7 dopo il trattamento con TRF è stata osservata quindi una significativa espressione dei geni codificanti per le proteine MIC-1 e EGR-1 (Comitato et al., 2010).

Il gruppo di ricerca guidato da Loganathan ha dimostrato l'induzione di tagli inattivanti, da parte dei T3, della *poly(ADP-ribose)polymerase*, un enzima di riparo del DNA, confermando il ruolo che tali molecole svolgono nell'induzione

dell'apoptosi e l'inibizione dei sistemi di sopravvivenza (NF- $\kappa$ B) n cellule cancerose quali le MDA-MB-231 (Loganathan *et al.*, 2013).

## **Il reticolo endoplasmatico**

Le prime conoscenze concernenti il reticolo endoplasmatico risalgono al 1945, anno in cui ebbero inizio le prime osservazioni *in toto* al microscopio elettronico di tali formazioni di fondo di cellule in coltura, che furono inizialmente definite con l'appellativo "nastriforme". Solo successivamente, nel 1952, furono coniat i termini "reticolo endoplasmatico" (Porter e Kallman, 1952) per descrivere quanto emergeva dalle osservazioni: elementi vescicolari e tubulari ramificati con localizzazione preferenziale nella regione perinucleare del citoplasma, nota come "endoplasma".

Gli studi iniziali descrivono due tipologie principali di strutture membranose del reticolo, distinte in base alle loro proprietà biochimiche e morfologiche, nonché i loro profili di sedimentazione. Il primo tipo corrisponde alla struttura tubulare rinvenuta nella frazione a bassa densità, mentre il secondo si riferisce alle vescicole sferiche presenti a livello della frazione ad alta densità.

Il reticolo endoplasmatico è associato ai meccanismi di endo- ed esocitosi alla base delle interazioni e degli scambi delle cellule con l'ambiente esterno. Tale

sistema interno di membrane, però presenta un'elevata complessità intesa in termini strutturali e funzionali. I ruoli a cui assolve sono molteplici, quali:

- sintesi, ripiegamento, modificazione e trasporto proteici;
- sintesi e distribuzione di fosfolipidi e steroli;
- riserva e rilascio dello ione  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno del citoplasma (Shröder, 2008).

Le perturbazioni di vario genere in tali funzioni, causano condizioni di alterazione dell'omeostasi del reticolo con conseguenziale aggregazione ed errato ripiegamento proteico (*misfolding*), comunemente definite «stress del reticolo». Tale situazione è stata osservata durante condizioni fisiologiche come la mancanza di nutrienti e il differenziamento dei linfociti di tipo B in plasmacellule, così come in condizioni patologiche, quali infezioni virali, ischemia/riperfusionazione tissutale ed ipertrofia dei cardiomiociti (Bravo *et al.*, 2013).

### **Struttura generale del reticolo endoplasmatico**

Un elevato numero di evidenze sperimentali hanno confermato che il reticolo endoplasmatico è un compartimento continuo che si estende dal nucleo al citosol.

Dal punto di vista morfologico, il reticolo è solitamente distinto in:

- RER (*rough endoplasmic reticulum*), così definito per la presenza di ribosomi adesi, sul versante citoplasmatico, alle membrane che lo costituiscono;
- SER (*smooth endoplasmic reticulum*), caratterizzato dall'assenza di ribosomi adesi alle proprie membrane.

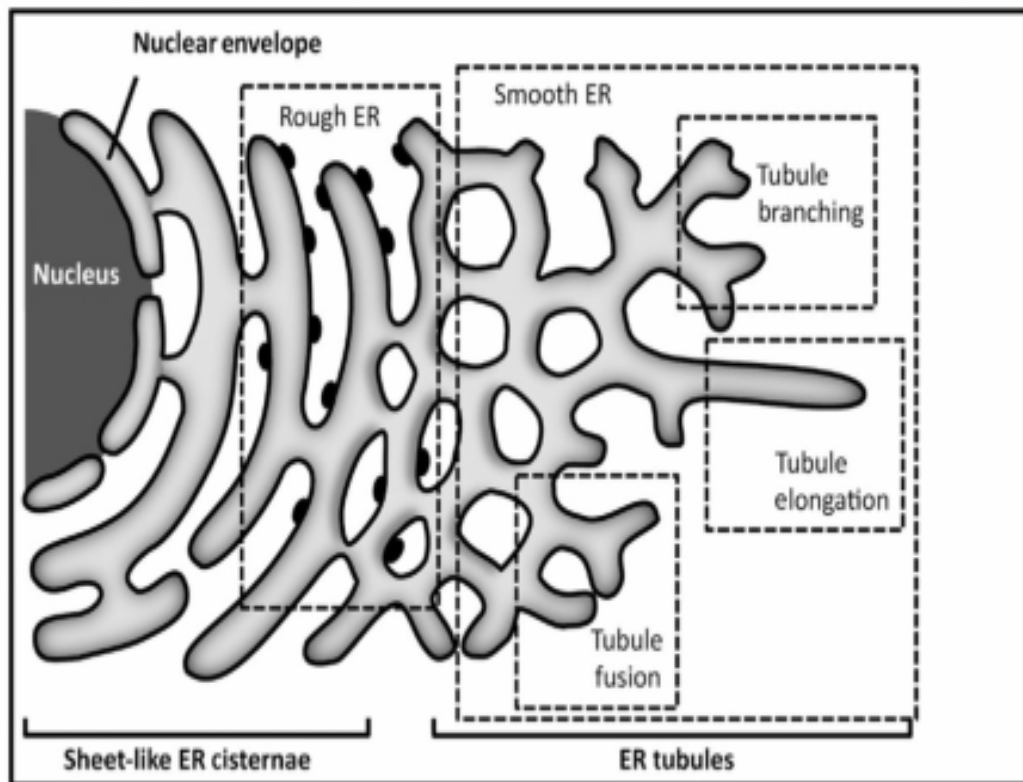
Le cellule che secernono un gran numero di proteine sono ricche in RER, mentre quelle che sintetizzano steroidi e le cellule muscolari hanno un SER abbondante.

La localizzazione dei due tipi di reticolo all'interno della maggior parte delle cellule non prevede, solitamente, specializzazioni spaziali; la situazione varia notevolmente in altre cellule, dove le tipologie di reticolo sono nettamente

separate e ben localizzate.

La morfologia del SER differisce molto da quella del RER, per la sua maggiore complessità della rete tubulare altamente ramificata che la costituisce rispetto all'organizzazione dell'altro.

Una classificazione contemporanea, non basata sulla presenza dei ribosomi sulle membrane piuttosto sulla morfologia delle stesse, distingue una porzione con una tipica organizzazione tubulare e un'altra in cisterne appiattite; riconosce, inoltre, un ulteriore dominio costituente il reticolo endoplasmatico, quale l'NE (*nuclear envelope*). La microscopia elettronica evidenzia che l'ER e l'NE formano una struttura continua, condividendo alcuni componenti comuni e distinguendosi per altre specifiche strutture, come le NUPs (*pore-forming nucleoporins*), tipiche del sistema di membrane che circonda il nucleo.



**Fig. 1i** : Struttura dell'ER (modificata da Bravo *et al.*, 2013).

## **Le funzioni del reticolo endoplasmatico**

SINTESI PROTEICA. Il reticolo endoplasmatico assolve, *in primis*, al carico, alle modificazioni e allo smistamento delle proteine di nuova sintesi che saranno componenti strutturali e funzionali propri o di altri organelli e strutture cellulari, o destinate alla secrezione.

I polipeptidi nascenti, infatti, sono dotati di una specifica sequenza segnale alla loro estremità N-terminale che li convoglierà direttamente all'ER. Tale sequenza non è conservata e generalmente contiene aminoacidi idrofobici nella regione centrale. Essa viene riconosciuta da una particolare SRP (*signal recognition particle*), costituita da sei polipeptidi legati ad un piccolo RNA, che fa da spola tra il citoplasma e il reticolo.

Quando la SRP riconosce e lega la sequenza segnale sul peptide nascente, si verifica un'interruzione della sintesi proteica in atto. Il complesso SRP-ribosoma trasloca, quindi, sulle membrane del reticolo, dove si lega all'SR (SRP Receptor). Al completamento di tale processo, vengono rilasciati sia l'SR che l'SRP e il polipeptide nascente viene effettivamente trasferito grazie all'azione del TC



(*translocon complex*).

Ulteriori importanti fasi della sintesi proteica sono il ripiegamento (*folding*) e il corretto assemblaggio dei polipeptidi di nuova sintesi in complessi sovramolecolari.

Il reticolo endoplasmatico è il principale organello cellulare coinvolto nell'omeostasi del calcio così come è importante considerare la stretta dipendenza del reticolo stesso allo ione, in quanto la maggior parte delle sue funzioni sono garantite dall'azione di enzimi, a loro volta, calcio-dipendenti.

La regolazione del calcio citoplasmatico dipende dall'attività di trasportatori localizzati nelle membrane del reticolo endoplasmatico, come SERCA (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) che ne riduce le concentrazioni importando lo ione dal citoplasma al lume del reticolo, oppure RyR (*Ryanodine receptor*) e IP3R (*inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*) che lo rilasciano nel citoplasma.

SINTESI LIPIDICA. Il reticolo endoplasmatico svolge un ruolo essenziale nella biogenesi lipidica, soprattutto per quanto concerne glicerofosfolipidi e sfingolipidi, i principali costituenti delle membrane biologiche.

Il reticolo endoplasmatico è la sede della sintesi del colesterolo, che ha ruoli importanti all'interno della cellula, sia strutturali, quale stabilizzatore delle membrane biologiche, che funzionali, quale precursore di importanti molecole come gli ormoni steroidei e gli acidi biliari.

## **L'ER e la degradazione proteica**

Una delle principali funzioni del reticolo endoplasmatico è la sintesi delle proteine destinate alle vie di secrezione della cellula. Le proteine neosintetizzate, subiscono un ripiegamento fino al raggiungimento di una conformazione consona alla loro funzione biologica, attraverso successive modifiche postraduzionali come N-glicosilazione e formazione di ponti disolfuro.

Allo scopo di esportare solo proteine funzionali e, quindi, correttamente ripiegate, il reticolo è la sede di un elevato numero di chaperoni che guidano il corretto *folding*. Allo stesso tempo essi svolgono un ruolo di controllo della qualità, provvedendo al sequestro e all'eventuale degradazione delle proteine che non hanno subito un corretto ripiegamento.

I sistemi di degradazione proteica principali sono:

- il meccanismo ubiquitinazione-proteasoma, denominato «ERAD» (*ER associated degradation*);
- il meccanismo lisosomiale, definito «macroautofagia», anche comunemente noto come «autofagia».

ERAD. Le proteine *misfolded/unfolded* vengono convogliate nuovamente nel citoplasma attraverso l'azione di specifiche proteine delle membrane del reticolo, che mediano il trasporto retrogrado, attraverso la formazione di canali all'interno del doppio strato fosfolipidico. La retrotrasporto è un processo attivo che richiede energia che deriva dall'idrolisi dell'ATP, catalizzata da altri enzimi specifici.

Le proteine trasportate nuovamente nel reticolo subiscono il processo di ubiquitinazione: l'ubiquitina<sup>4</sup> viene legata covalentemente, in un numero ripetuto e cospicuo di volte, ad un residuo di lisina del substrato proteico da degradare. La catena di poliubiquitina così formata, funge da segnale di degradazione e la proteina viene convogliata all'effettivo sistema di degradazione: il proteasoma. Dopo l'accesso all'interno del proteasoma<sup>5</sup>, la proteina diviene substrato delle molteplici attività proteolitiche ivi presenti, che effettuano la completa degradazione della stessa e il riciclo della catena di poliubiquitina.

---

<sup>4</sup> L'ubiquitina è un peptide formato da 76 amminoacidi, di peso molecolare 8500 Da. È così denominata proprio perché è ubiquitaria, altamente conservata tra le specie (Meusser *et al.*, 2005).

<sup>5</sup> Il proteasoma è un complesso molecolare con conformazione cilindrica, con una via di accesso e di uscita per le proteine ubiquitinate da degradare. È costituito da numerose sub unità proteiche organizzate in due anelli centrali e due cappucci alle estremità (Meusser *et al.*, 2005).

AUTOFAGIA. L'autofagia è indotta dalla deprivazione di nutrienti. La chinasi AMPK risponde ai bassi livelli energetici della cellula, attraverso la segnalazione diretta mediata dalla riduzione del rapporto ATP/AMP. La chinasi così attivata, innesca una cascata di fosforilazione che porta, in ultima analisi, all'attivazione di proteine indispensabili per l'induzione dell'autofagia. Esse, infatti, medieranno il reclutamento, la nucleazione e l'espansione delle doppie membrane del reticolo che sequestreranno le sostanze destinate alla degradazione. Le proteine, i lipidi e anche interi organelli che solitamente costituiscono il contenuto di tali vescicole, saranno degradati attraverso l'azione degli enzimi lisosomiali con i quali entrano in contatto dopo la fusione delle suddette vescicole e i lisosomi stessi.

Il reticolo endoplasmatico può essere considerato, quindi, come una fonte di membrane da cui originano gli autofagosomi.

L'ER-fagia, la mitofagia e la perossifagia, sono processi autofagici organelli-specifici che causano la degradazione del reticolo endoplasmatico, dei mitocondri e dei perossisomi, rispettivamente.

L'autofagia del reticolo è un meccanismo particolare che deriva dall'attivazione di una cascata di geni specifici.

Le condizioni di alterazioni causano, fin dai primi istanti, un aumento del volume del reticolo, atto a prevenire l'aggregazione tra le proteine in esso contenute. Successivamente si verifica il sequestro del materiale degradato all'interno delle vescicole a doppia membrana. È fondamentale ribadire l'aspetto che tali strutture vescicolari, così come il loro contenuto, derivano dal reticolo endoplasmatico stesso. Ne consegue l'ipotesi che l'ER ingloba se stesso perché si attui il processo autofagico, attraverso la successiva fusione delle vescicole con i lisosomi cellulari e la digestione enzimatica del loro contenuto.

Inoltre, il processo di formazione di vescicole, si rivela fondamentale per il reticolo perché ne permette il ripristino delle normali dimensioni, che erano aumentate come conseguenza immediata allo stress subito. Tale aspetto è stato evidenziato in studi su mutanti privi di proteasi vacuolari in cui, però, il reticolo era comunque in grado di formare le vescicole di degradazione, allontanando le proteine alterate e ripristinando i propri parametri dimensionali e funzionali (Bernales *et al.*, 2006; Barnles *et al.*, 2007).

Nonostante l'ERAD sia stata descritta come il meccanismo preferenziale di

degradazione di proteine *unfolded/misfolded*, un ruolo ugualmente importante è riconosciuto al sistema autofagico. Infatti, studi recenti confermano come l'autofagia sia parimenti innescata durante le condizioni di stress del reticolo endoplasmatico ed è utile per la protezione della cellula dalla degenerazione e perché le risposte da essa attuate non conducano forzatamente alla morte.

### **Aspetti generali della UPR**

Il reticolo endoplasmatico è un sistema cellulare di membrane caratterizzato da un elevato dinamismo, le cui complesse funzioni possono essere significativamente influenzate da una moltitudine di parametri dipendenti dall'ambiente interno ed esterno alla cellula stessa. Fattori quali la disponibilità di ossigeno (ipossia) e glucosio (ipoglicemia), l'ipertermia, l'acidosi, i livelli di calcio, il potenziale redox dell'ambiente, i livelli energetici, possono ripercuotersi sul corretto funzionamento del reticolo.

Le condizioni che alterano l'omeostasi del reticolo endoplasmatico e il suo corretto funzionamento generano uno stato particolare conosciuto come «stress del reticolo».

La conseguenza diretta a tale situazione, che può rivelarsi estremamente dannosa per l'integrità cellulare, è l'accumulo di proteine non ripiegate (*unfolded*), o erroneamente ripiegate (*misfolded*) tossiche all'interno del lume reticolare. Il ripiegamento proteico è un processo complesso che dipende



dall'interazione di chaperoni, foldasi, enzimi di glicosilazione, nonché dagli stessi livelli di calcio e il potenziale redox dell'ambiente.

L'aumento delle concentrazioni di proteine *unfolded*, *misfolded*, insolubili o in vario modo danneggiate, può causare danni irreparabili alle cellule, che rappresentano vere e proprie “minacce proteotossiche” che ne inficiano la sopravvivenza.

Per ovvie ragioni, di fondamentale importanza si rivela il ripristino della suddetta omeostasi, ove possibile, per la corretta progressione del ciclo cellulare.

L'insieme della risposte cellulari allo stress del reticolo è conosciuto come UPR (*unfolded protein response*).

In un primo momento, la UPR tenta di restaurare la normale funzionalità del reticolo endoplasmatico, facendo uso di molteplici strategie di azione in parallelo o in serie. Ad esempio, l'espressione di chaperoni aumenta al fine di prevenire l'aggregazione proteica e garantire il corretto ripiegamento delle stesse. Nel contempo, viene ridotto il transito delle proteine in ingresso attraverso le membrane del reticolo e ne viene inibita, temporaneamente, la stessa sintesi. Inoltre, il reticolo aumenta sensibilmente il suo volume attraverso l'incremento

della sintesi dei lipidi di membrana, come evidenziano numerosi risultati di studi ultrastrutturali. In ultima analisi, fondamentale è anche la ERAD (*ER-associated degradation*) per le proteine *unfolded/misfolded* che non hanno subito un corretto processamento durante la fase di recupero della UPR, o l'attivazione dell'autofagia, meccanismo atto al riciclaggio di strutture cellulare soprannumerarie o difettose.

Durante la UPR, le perturbazioni dell'omeostasi del reticolo sono avvertite e trasdotte, attraverso differenti segnali, al citoplasma e al nucleo perché venga attuata una risposta compensatoria. In tale processo sono coinvolti un gran numero di “sensori” dotati, tutti, di domini che si estendono dal citoplasma al lume del reticolo, attraversandone, come ponti, le membrane.

Attualmente, sono stati descritti tre rami fondamentali della UPR: IRE1 (*inositol-requiring kinase 1*), ATF6 (*activating transcription factor-6*), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) (Ron e Walter, 2007).

### **IRE-1: il ramo centrale della UPR**

La cascata di segnalazione del sistema UPR è attivata da specifiche proteine integrali di membrana del reticolo endoplasmatico. Tali proteine sono dotate di una porzione rivolta all'interno del lume del reticolo e di una porzione citoplasmatica. Le estremità rivolte nel lume, con caratteristiche recettoriali, pescano nell'ambiente del reticolo, interagendo con le proteine neoformate che subiscono il proprio ripiegamento funzionale. Le estremità citoplasmatiche di tali proteine, invece, sono le porzioni effettrici che hanno la capacità di interagire, attraverso l'interazione con altri mediatori, con gli apparati trascrizionali e traduzionali della cellula.

Il primo trasduttore di stress è stato identificato nel lievito attraverso lo screening delle mutazioni che bloccano l'attivazione del sistema inducibile UPR (Ron and Walter, 2007).

Il gene in questione, *ire-1*, codifica per una proteina integrale di membrana di tipo 1, a singolo passo, localizzata a livello del reticolo endoplasmatico, ed è dotata dell'estremità N-terminale rivolta nel lume e l'estremità C-terminale

citoplasmatica provvista, inoltre, di una regione effettrice con doppia attività enzimatica, sia chinasi che endoribonucleasica.

IRE-1 (*inositol-requiring enzyme-1*) è lo *starter* del ramo della UPR maggiormente conservato dal punto di vista filogenetico.

In circostanze di *unfolding/misfolding* proteico, IRE-1 oligomerizza nel piano della membrana del reticolo causando, in tal modo, la trans-autofosforilazione dei propri domini chinasi venutisi a giustapporre. L'oligomerizzazione appena descritta può essere considerata conseguenza diretta del legame della porzione rivolta nel lume del reticolo di IRE-1 con proteine *unfolded/misfolded*. Essa, infatti, mostra affinità strutturale con i domini leganti peptidi (*peptide-binding domains*) del complesso maggiore di istocompatibilità.

Inoltre, altre ipotesi propongono il rilascio di specifici chaperoni (BiP/GRP-78) repressori dell'oligomerizzazione, o una combinazione di entrambi i fenomeni di trasduzione, ed in particolare: l'oligomerizzazione è dovuta al rilascio da parte degli chaperoni repressori, mentre l'attivazione è mediata dal legame con proteine mal ripiegate o non ripiegate nel lume del reticolo.

Attraverso un meccanismo di trasduzione scarsamente conosciuto, la trans-autofosforilazione del dominio chinasi di IRE-1 attiva la sua ulteriore porzione effettrice: tale endoribonucleasi, infatti, attraverso la sua attività enzimatica, provvede allo *splicing* di uno specifico substrato. Il candidato è l'mRNA che codifica per il fattore XBP-1 (*X-box binding protein-1*).

IRE-1 compie due tagli sull'mRNA precursore di XBP-1 portando, quindi, all'allontanamento dell'introne. Le fasi successive prevedono la saldatura delle nuove estremità 5' e 3' formatesi e la formazione di un mRNA definitivo che sarà tradotto in un attivatore specifico per i geni della UPR.

Gli enzimi responsabili delle fasi appena descritte non sono stati ancora identificati, ma recenti scoperte indicano che il taglio intronico e la saldatura delle estremità avvengono in associazione con il reticolo endoplasmatico, dato il forte legame dell'mRNA di XBP-1 con le stesse membrane.

Il precursore e la forma matura del messaggero di XBP-1 sono tradotti entrambi all'interno della cellula. Le proteine che ne derivano sono marcatamente differenti in quanto, la porzione intronica nel precursore, cambia completamente lo schema di lettura; esse, inoltre, mostrano proprietà funzionali differenti.

La forma sXBP-1, derivante dalla traduzione del messaggero maturo, è molto più stabile e svolge una potente azione attivante sui geni bersaglio della UPR, contrariamente alla forma alternativa uXBP-1, codificata dal precursore dell'mRNA, molto più labile e con caratteristiche repressive.

La via appena descritta gode di sistemi di controllo attraverso i quali avviene la modulazione dell'intera trasduzione del segnale. Gli stessi mRNAs di XBP-1 sono, infatti, bersagli molecolari all'interno della stessa cascata di segnalazione.

I livelli dei messaggeri di XBP-1 aumentano decisamente come effetto dell'induzione delle prime fasi della UPR, e continuano ad aumentare per tutta la durata della fase di stress del reticolo, per decrescere, poi, durante la fase di ripristino e la conseguenziale inattivazione di IRE-1. I precursori dei messaggeri di XBP-1 neotrascritti non subiscono *splicing*, e codificano per un polipeptide con funzione inibitoria nella cascata di segnalazione, in quanto promuove il sequestro dello stesso dal nucleo e ne favorisce la degradazione attraverso il proteasoma.

Secondo le ipotesi, la terminazione del segnale avviene attraverso la combinazione di più fattori, quali l'eterodimerizzazione delle forme alternative di

XBP-1, uXBP-1 e sXBP-1, e la competizione delle stesse per i specifici siti di legame. Si riconosce, inoltre, per la forma immatura dell'mRNA di XBP-1, la proprietà fondamentale di rendere più fine la regolazione dei geni bersaglio.

Il ruolo e l'importanza funzionali di IRE-1 e HAC-1 (omologo di XBP-1 nei Metazoi) sono stati ampiamente dimostrati attraverso studi condotti sul lievito, che confermano la diretta connessione dei difetti di espressione genica con la mancanza degli stessi meccanismi all'interno delle cellule.

La situazione rimane, invece, piuttosto oscura per gli Eucarioti superiori.

Le cellule di Mammiferi sono dotate di due paraloghi di IRE-1, quali IRE-1 $\alpha$  e IRE-1 $\beta$ , che condividono un'omologia strutturale ma si differenziano nelle loro funzioni. Nelle condizioni di stress del reticolo, infatti, IRE-1 $\alpha$  attiva la via di trasduzione descritta, mentre IRE-1 $\beta$  attenua la sintesi proteica mediando il taglio proteolitico sito-specifico dell'RNA ribosomiale 28S.

Studi condotti su embrioni murini, difettivi dei geni per IRE-1 o XBP-1, evidenziano come essi non continuano lo sviluppo e si verificano interruzioni delle gestazioni in periodi sovrapponibili in entrambi i casi. Inoltre, approcci computazionali estesi all'intero genoma hanno rivelato come nessun altro mRNA

nei Mammiferi mostri una sovrapposizione con le ampie sequenze di lettura e introni fiancheggiati dai siti di taglio tipici di IRE-1. Proprio per questo il precursore del messaggero di XBP-1 è considerato l'unico substrato di IRE-1.

In altri sistemi di riferimento, quale *Caenorhabditis elegans*, è stata evidenziata una non corrispondenza tra i difetti fenotipici e le mutazioni dei geni *ire-1* e *xbp-1*, suggerendo l'esistenza di altre vie di segnalazione alternative a quella di IRE-1.

Inoltre, con elevata probabilità, nei Metazoi IRE-1 svolge la sua funzione di trasduttore con meccanismi che esulano dalla sua attività nucleotidica, così come subisce regolazioni ad opera di altri fattori, come i componenti pro-apoptotici della famiglia Bcl-2 (Bax e Bak), e altri importanti modulatori del metabolismo cellulari, ritrovandosi coinvolta in altre vie di segnalazione interconnesse alla UPR. Ad esempio, IRE-1 $\alpha$  nei Mammiferi, nelle condizioni di stress attiva, JNK (*Jun-N-terminal-kinase*) ed interagisce con i componenti della macchina di morte della cellula, come la caspasi 12, in maniera indipendente dalla sua attività RNasica, o promuovendo l'autofagia, o promuove la sopravvivenza cellulare attraverso l'attivazione di c-jun. Tali evidenze confermano il ruolo centrale di tali



trasduttori nell'attivazione dei sistemi alternativi di morte programmati o sopravvivenza cellulare connessi allo stress del reticolo endoplasmatico e alla capacità stessa di recupero della UPR.

### **ATF6: la UPR e la proteolisi regolata**

Gli studi volti alla ricerca di ulteriori proteine che regolano i geni della UPR hanno portato alla luce numerosi fattori trascrizionali che regolano l'insieme di quei geni dotati di elementi CRE (*cAMP response element*) e hanno condotto, in particolare, all'identificazione di ATF-6, nonché il più noto.

Dopo dieci anni dalla sua iniziale descrizione, l'attività trascrizionale di ATF-6 è stata effettivamente connessa alla UPR nei Mammiferi, in quanto è stato dimostrata la sua capacità di legarsi agli ERSE (*ER stress response elements*) nei promotori dei geni bersaglio. Tale fattore solo recentemente, quindi, è stato definito membro fondatore di una nuova classe di trasduttori dello stress del reticolo, specifici per i Metazoi. La sub-famiglia dei fattori CREB3 si associa, infatti, a ATF6 per la propria funzione di “sensore”. Essi sono espressi in grado variabile nei vari tipi cellulari, così come variano nella loro abilità di iniziare le segnalazioni di stress.

ATF6 è conosciuto come una proteina integrale di membrana, a passo singolo di tipo 2. In esso si riconoscono tre domini strutturali, quali l'estremità C-

terminale nel lume, dotata di GLS (*Golgi localization sequences*), la porzione transmembrana e l'estremità N-terminale citosolica. Inoltre, ne sono state descritte due isoforme ATF-6 $\alpha$  e ATF-6 $\beta$  che giocano ruoli opposti nella UPR, in quanto ATF-6 $\beta$  è un repressore trascrizionale del segnale trasdotto da ATF-6 $\alpha$ , mediando quindi un'azione regolatrice negativa sul ramo della UPR mediato da quest'ultimo. L'isoforma repressiva, infatti, compete con quella attivante per il legame ai promotori dei geni bersaglio. Durante la UPR, i livelli di ATF-6 $\beta$  regolano l'intensità e la durata delle risposte all'azione di ATF-6 $\alpha$ , nonché la suscettibilità della cellula alla morte.

In situazioni basali, ATF-6 è ritenuto all'interno del reticolo endoplasmatico attraverso l'interazione con lo chaperone BiP//GRP-78 e la calreticulina. Durante le condizioni di stress, ATF-6 viene trasportato dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi, dove subisce tagli proteolitici operati da specifiche proteasi ivi residenti. Il primo taglio avviene ad opera di S1-P (*site 1-protease*), mentre il secondo ad opera della S2-P (*site 2-protease*), a carico della regione intermembrana della proteina, in modo che venga rilasciata la porzione citosolica (N- terminale) legante il DNA, definita come p50ATF-6/ATF-6f ("f":

frammento).

Data la suddetta proprietà, tale frammento trasloca nel nucleo per attivare l'espressione genica. ATF-6f promuove la trascrizione de geni coinvolti nella UPR, come quelli codificante lo chaperone BiP/GRP78, lo stesso XBP-1, la pompa per il calcio SERCA e il fattore di trascrizione CHOP.

Inoltre, ATF-6f riveste un ruolo fondamentale anche nella regolazione del volume del reticolo endoplasmatico con un meccanismo indipendente, quindi, dall'attivazione di XBP-1, e potenzia l'adattamento cellulare alle condizioni croniche di stress del reticolo per la cellula.

L'apparato proteolitico appena descritto, responsabile dell'attivazione delle proteine ATF-6, è condiviso con le proteine SREBPs (*sterol response element binding proteins*), fattori trascrizionali coinvolti nel metabolismo lipidico. In entrambi i casi, infatti, è previsto il trasporto dei precursori inattivi dal reticolo endoplasmatico all'apparato del Golgi. I segnali di inizio del trasferimento nei due sistemi di trasduzione restano, però , differenti: il rilascio causato dalla repressione operata dagli steroli per le proteine SREBPs; l'aumento delle concentrazioni di proteine *unfolded/misfolded* nel caso di ATF-6. Tale aumento di

concentrazioni può essere avvertito dai domini proteici rivolti nel lume del reticolo in maniera diretta o indiretta (mediata da chaperoni, BiP/GRP-78), così come descritto per IRE1, che causa quindi l'immediato trasferimento di ATF-6 tra i compartimenti cellulari.

Numerose altre proteine sono correlate ad ATF-6 e sono ancorate alle membrane del reticolo, come evidenziano gli studi condotti per l'analisi strutturali delle stesse; è stato dimostrato che esse sono attivate attraverso taglio proteolitico regolato da condizioni di stress del reticolo. Inoltre, alcune proteine non hanno attività regolatrice, ma aumentano la capacità di secrezione di alcune cellule in determinati stati flogistici di specifici organi e tessuti, evidenziando, quindi, una correlazione diretta tra stress del reticolo e stato fisio-patologico dell'organismo.

### **PERK: la UPR e il controllo traduzionale**

La terza via di segnalazione dello stress del reticolo è operata dal fattore PERK, che mostra caratteristiche parzialmente simili a IRE-1.

PERK, infatti, è una proteina integrale di tipo 1, inserita nelle membrane del reticolo endoplasmatico, con la porzione recettoriale rivolta nel lume dello stesso. Tali domini risultano filogeneticamente correlati, nonché strutturalmente e funzionalmente simili, e sperimentalmente intercambiabili.

La porzione citoplasmatica di PERK contiene, allo stesso modo, un dominio con funzione chinasi, che si attiva attraverso una trans-autofosforilazione e l'oligomerizzazione nelle cellule con stress del reticolo.

La differenza sostanziale che distingue PERK da IRE-1 consiste nel numero di substrati verso cui è rivolta l'attività enzimatica dei domini chinasi: mentre IRE-1 attua una semplice autofosforilazione, PERK fosforila la subunità  $\alpha$  del fattore eIF-2 (*eukaryotic translation initiation factor-2*) a livello della Ser51. Tale fosforilazione inibisce il fattore di scambio guanosinico eIF-2B, un complesso

proteico pentamerico che ha la funzione di convertire eIF-2 nella sua forma attiva che lega GTP. I bassi livelli di eIF-2 in forma attiva causano la riduzione a valle l'intero processo traduzionale, inibendone l'inizio. Ciò contribuisce all'accumulo delle proteine neoformate nel lume del reticolo già stressato. Per la riduzione del carico del reticolo è fondamentale la fosforilazione subita eIF-2 $\alpha$  operata da PERK, in quanto contribuisce alla trasduzione del segnale della UPR attraverso l'attivazione trascrizionale di molti geni bersaglio coinvolti.

I profili di espressione analizzati in cellule *knock-out* per il gene codificante PERK mostrano una sintesi difettiva di specifici mRNAs implicati nel corretto svolgimento della UPR. Difetti simili vengono osservati anche in cellule con mutazione a livello della Ser51Ala del fattore eIF-2 $\alpha$ , che impedisce la fosforilazione dello stesso. Tali evidenze confermano il ruolo cruciale di PERK nel controllo dell'espressione di numerosi geni coinvolti nel programma di risposta allo stress del reticolo, così come la forte dipendenza dalla fosforilazione del fattore eIF-2 $\alpha$ .

La correlazione tra la fosforilazione di eIF-2 $\alpha$  e l'espressione di geni attivati è conservata anche negli Eucarioti. Nel lievito, la suddetta fosforilazione causa

l'aumento della trascrizione di GCN-4 (*general control non-depressible-4*), un fattore di trascrizione implicato nella risposta cellulare alla deprivazione di amminoacidi.

La regione 5' non tradotta del gene *gcn-4* contiene a monte una uORFs (*upstream open reading frame*) non codificante inibitoria che previene la traduzione della ORFs codificante a valle nelle cellule non stressate. Durante le condizioni di stress, in cui è limitata l'attività del fattore eIF-2 ad opera della fosforilazione a carico di eIF-2 $\alpha$ , i ribosomi riescono a superare l'ostacolo delle uORFs e a condurre la traduzione di *gcn-4*. Tale aspetto è conservato nei Mammiferi dal fattore trascrizionale ATF-4 (omologo di Gcn-4 nei Metazoi), la cui trascrizione è, a sua volta, indotta dalla fosforilazione di eIF-2 $\alpha$ .

Elevati livelli di eIF-2 $\alpha$  fosforilato possono attivare anche NF $\kappa$ B, ma la determinazione dei meccanismi di azione resta ancora per alcuni aspetti controversa. Inoltre restano da chiarire i meccanismi che confermino il ruolo di NF $\kappa$ B nell'induzione della UPR dipendente da PERK e indipendente da ATF-4, così come l'individuazione di numerosi effettori molecolari attivati dalla fosforilazione di eIF-2 $\alpha$  che intervengono nella via di segnalazione di PERK.



Inoltre un gran numero di meccanismi di trasduzione convergono sul fattore eIF-2 $\alpha$  fosforilato e attivano un insieme comune di geni, rimanendo comunque esuli dallo stress del reticolo.

Al fine della sopravvivenza, le cellule devono finemente regolare i livelli di eIF-2 $\alpha$  fosforilato. L'attivazione di PERK, operata in condizioni di stress, è rapidamente ripristinata, durante la stessa fase di recupero dell'omeostasi del reticolo, attraverso la defosforilazione del fattore. I meccanismi di regolazione e le fosfatasi coinvolte restano ancora sconosciuti, ma è stato stabilito che il fattore eIF-2 $\alpha$  fosforilato subisce una regolazione negativa. Sono stati identificati due componenti di tale processo, quali GADD-34 (*growth arrest and DNA-damage-inducible protein-34*) e CReP (*constitutive repressor of eIF-2 $\alpha$  phosphorylation*). Essi codificano per le subunità di due complessi con attività fosfatasica che in maniera indipendente defosforilano eIF-2 $\alpha$ . CReP è costitutivamente espresso e contribuisce alla defosforilazione basale del fattore bersaglio, mentre GADD-34 è indotto dallo stesso programma di espressione di geni attivato dalla medesima fosforilazione di eIF-2 $\alpha$ , e svolge un importante *feedback* negativo sull'intera via di segnalazione.

### **Integrazione delle risposte dei rami della UPR**

I “sensori” dello stress del reticolo endoplasmatico fanno uso di meccanismi ed effettori differenti per l’attivazione della UPR ma, in alcuni punti, le tre vie di trasduzione comunicano. Uno dei primi esempi è la stretta relazione che intercorre tra la cascata di segnalazione attivata da IRE-1 $\alpha$  e ATF-6. La forma di XBP-1 derivante dalla traduzione del messaggero non maturo è un regolatore negativo della forma di XBP-1 derivante dal mRNA maturo, ma indirizza anche la forma attiva di ATF-6 al proteasoma. D’altro canto, lo stesso ATF-6 forma eterodimeri con XBP-1 per promuovere la degradazione dei componenti ERAD.

La via di segnalazione di PERK è collegata a IRE-1 $\alpha$  e ATF-6, così come evidenziano risultati di studi condotti con forme dominanti negative<sup>6</sup> di PERK che attivano le vie di trasduzione di ATF-6 e XBP-1. Altri studi, inoltre, mostrano che PERK potenzia la sintesi di ATF-6 e il suo trasferimento dal reticolo endoplasmatico all’apparato del Golgi.

---

<sup>6</sup>Una mutazione dominante negativa a carico di una forma allelica di un gene porta alla formazione di un prodotto mutato, il quale interferisce anche con la funzione di quello derivante dall’altro allele wild-type, provocando una perdita totale di tale funzione, nonostante la presenza del prodotto genico.

La connessione che si evince tra le tre vie di segnalazione della UPR dimostra l'insorgenza dei diversi difetti a vari livelli associati alla perdita anche di un singolo "sensore" implicato nelle vie di segnalazione.

Le risposte che derivano dall'azione integrata dei sensori molecolari dello stress del reticolo contribuiscono all'adattamento o alla morte della cellula, ma rimane sostanzialmente sconosciuta la modalità con la quale ognuno dei diversi rami contribuisce all'effetto biologico finale. Un numero svariato di lavori condotti a tal fine dimostrano come l'attività di IRE-1 e ATF-6 sono attenuate dalla persistenza dello stress del reticolo, condizione che non altera invece l'attività di PERK. Le evidenze sperimentali confermano, infatti, il ruolo di PERK nell'ostacolare la proliferazione cellulare a vantaggio dell'apoptosi. In contrapposizione, l'attivazione della via di IRE-1 $\alpha$ , per un analogo periodo di tempo, non promuove la morte cellulare, a vantaggio della proliferazione. Ciò dimostra che il destino che segue lo stress del reticolo per una cellula dipende essenzialmente dall'attivazione differenziale dei tre rami della UPR.

## UPR e metabolismo cellulare

Uno dei principali obiettivi della UPR è il ripristino dell'equilibrio tra proteine caricate e ripiegate e all'interno del reticolo endoplasmatico. Da un punto di vista metabolico, il *folding* proteico nel reticolo endoplasmatico è un processo dispendioso, per le elevate richieste energetiche. Ad esempio, gli zuccheri sono necessari per la N-glicosilazione delle proteine neosintetizzate, gli equivalenti riduttivi sono consumati per la formazione dei ponti disolfuro e un appropriato supplemento di ATP è essenziale per l'accumulo di calcio nel reticolo e l'attività degli chaperoni.

Uno degli effetti più noti dell'attivazione della UPR sul metabolismo cellulare è l'attenuazione della sintesi proteica attraverso la fosforilazione del fattore eIF-2 $\alpha$ . Come regolazione negativa riduce il carico di proteine nel reticolo ed aumenta la disponibilità di ATP per altri scopi, quali il corretto *folding* delle proteine o la degradazione per quelle non ripristinabili. Nonostante ciò, solo recentemente il *cross-talk* tra la UPR e i principali regolatori metabolici hanno ricevuto la dovuta attenzione (Bravo *et al.*, 2013).

## UPR e patologie

Le alterazioni fisiopatologiche delle concentrazioni di ioni calcio intracellulari connesse alla segnalazione dello stress del reticolo endoplasmatico, sono il segno distintivo di un'ampia gamma di patologie come il diabete mellito di tipo 2, l'insulino-resistenza, disturbi cardiovascolari e il morbo di Alzheimer (Kellery *et al.*, 2002; Lim *et al.* 2009). Tali patologie sono caratterizzate da una marcata riduzione del metabolismo cellulare: i meccanismi molecolari responsabili di tali disfunzioni restano però non completamente compresi. Come precedentemente evidenziato, le alterazioni nei contatti tra reticolo endoplasmatico e mitocondri e, in maniera più rilevante, quelle a carico del trasferimento degli ioni calcio tra essi, possono causare disfunzioni mitocondriali e gli squilibri metabolici osservati in tali patologie. Inoltre, studi recenti individuano nelle alterate relazioni reticolo/mitocondri un'importante concausa nella crescita e nella progressione tumorale di determinate cellule.

Studi su modelli sperimentali hanno evidenziato l'incremento della UPR a carico degli epatociti di animali obesi (Ozacn *et al.*, 2004), così come della

concentrazione di *markers* specifici dello stress del reticolo come GRP-78, sXBP-1, eIF-2 $\alpha$  fosforilato e JKK (Boden *et al.*, 2008) nel tessuto adiposo di individui con insulino-resistenza.

Tutte le vie della UPR sono attivate durante il verificarsi di danni ischemici (Glembotski, 2007). Infatti, la mancanza di ossigeno e nutrienti rappresenta una seria minaccia per la vitalità dei cardiomiociti. A livello meccanicistico, l'insufficiente produzione di ATP, rende impossibile la formazione dei ponti disolfuro nelle proteine neosintetizzate e favorisce un'inappropriata regolazione del calcio, entrambi processi considerati alla base dell'induzione della UPR, in quanto il loro cattivo funzionamento potrebbe inficiare importanti meccanismi nella formazione delle proteine (*folding*, glicosilazione, ecc.).

Nei neuroni e in molti modelli sperimentali di malattie neurodegenerative, il calcio svolge un importante ruolo come secondo messaggero, controllando le funzioni sinaptiche e la stessa vitalità cellulare. Nelle condizioni basali, le concentrazioni citoplasmatiche di Ca<sup>2+</sup> sono comprese nell'intervallo 5 nM e 50 nM, mentre nel reticolo endoplasmatico raggiungono i 300  $\mu$ M (Pozzan *et al.*, 1994). Molti chaperoni contenuti nel reticolo necessitano di concentrazioni di ioni

calcio ottimali per la loro attività nel ripiegamento e nella maturazione proteici. Ne deriva che l'alterata attività di tali proteine e, quindi, variazioni a carico del reticolo, possono essere alla base dell'eziopatogenesi di molti disturbi neurologici (Corbett *et al.*, 1999; Ashby e Tepikin, 2001). Inoltre, l'aumento delle concentrazioni di ioni calcio nel citoplasma, a causa di una mancata regolazione delle stesse, può indurre la cellula neuronale alla morte programmata per apoptosi indotta dai mitocondri, data l'importante ruolo di questo ione in tale processo. Ne consegue, nuovamente, l'importante mantenimento delle relazioni reticolo/mitocondri (Wang *et al.*, 1999).

L'elevato tasso proliferativo delle cellule tumorali richiede un aumento della sintesi di proteine e membrane. Queste variazioni inducono i notevoli cambiamenti a carico del macchinario biosintetico del reticolo endoplasmatico e l'accumulo degli errori a suo carico per l'aumentato tasso di incidenza degli errori compiuti dallo stesso. In tale contesto, sono essenziali le fasi di adattamento che implicano un aumento (non sempre attuabile) delle capacità cellulari di sostenere un corretto *folding* proteico, per sostenere il sovraccarico funzionale.

La proliferazione cellulare tipica della crescita tumorale è spesso associata condizioni di ipossia e mancanza di nutrienti, comunemente definita «*starvation*». Una delle possibilità è che le cellule si adattino a tali condizioni di stress attraverso l'attivazione di sistemi UPR, quale preludio per la progressione neoplastica, soprattutto in quelle cellule in cui lo stress protratto del reticolo conduce ad adattamenti piuttosto che a ripristino dell'omeostasi o risolutiva morte per apoptosi.

Con l'attuazione della UPR come stato adattativo, le cellule tumorali, infatti, si distinguono per la loro capacità di sopravvivenza in particolari condizioni proibitive che condurrebbero a morte le normali cellule dei Mammiferi, quali elevati livelli di ROS e alti tassi di sintesi proteica, oltre che la già citata *starvation*. Entrambi questi aspetti sono importanti oggetti di studio in atto per poter confermare il ruolo della UPR nei meccanismi molecolari che portano all'oncogenesi e alla progressione dei tumori, nonché la possibilità di mirare ad essa per eventuali strategie terapeutiche. I bersagli terapeutici più plausibili, dai dati emergenti dagli studi preliminari, riguardano tutti aspetti derivanti dalla UPR: si progetta l'uso di sostanze che inducano l'accumulo di proteine *misfolded* che



possano attivare meccanismi risolutivi alternativi quali ERAD, nonché capaci di inibire i comportamenti adattativi e antiapoptotici (Li *et al.*, 2011).

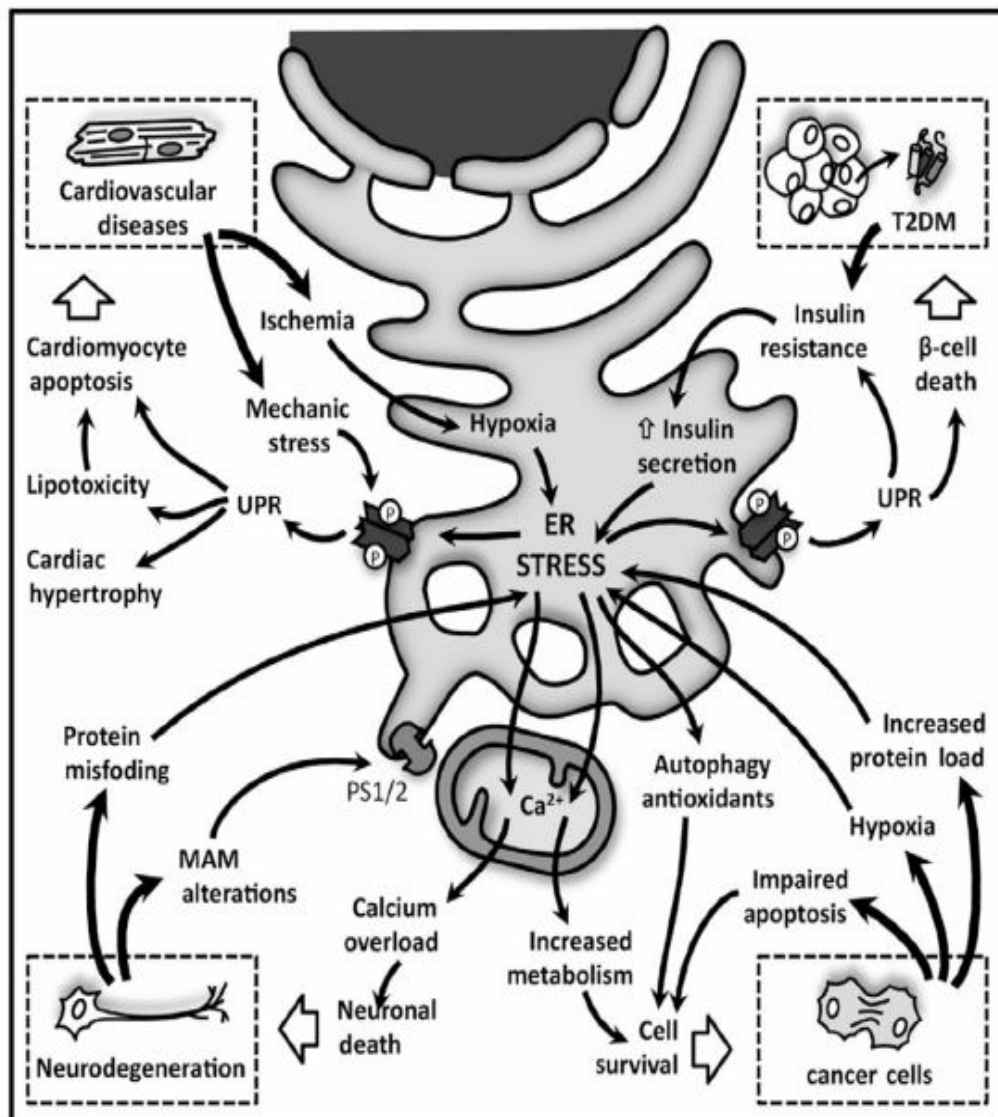


Fig. 2i: Reticolo endoplasmatico e patologie (da Bravo et al., 2013).

## **Apoptosi**

Il termine apoptosi è stato usato per la prima volta da Kerr, Wyllie e Currie nel 1972 per descrivere una particolare forma di morte cellulare, sebbene molti caratteri che contraddistinguono questo processo furono descritti già molti anni prima.

L'apoptosi si verifica normalmente durante lo sviluppo ontogenetico, come un meccanismo morfogenetico, od omeostatico, volto a mantenere costante il numero di cellule che costituisce un tessuto.

Esso, inoltre, interviene come meccanismo di difesa di cui la cellula dispone per fronteggiare le conseguenze derivanti da danni ormai avvenuti. Un esempio sono le reazioni immunitarie, in cui le cellule killer muoiono per apoptosi dopo aver fagocitato gli agenti estranei venuti a contatto con l'organismo. Le cellule attuano l'apoptosi anche in risposta ad agenti nocivi di vario genere, affinché essi non abbiano conseguenze devastanti sull'andamento del ciclo vitale delle stesse.

Molti sono gli stimoli, sia fisiologici sia patologici, in grado di attivare questo tipo di morte cellulare, ma non tutti le cellule rispondono con la morte allo

stesso tipo di stimolo. Le radiazioni o i composti usati per il trattamento chemioterapico del cancro sono rispettivamente agenti fisici e chimici di cui, in modo esemplificativo, si ripropone la natura dannosa della loro azione sul DNA e la loro capacità di indurre morte cellulare per apoptosi. Il medesimo effetto può essere attuato da altri agenti, anche fisiologicamente prodotti dall'organismo, quali gli ormoni corticosteroidi.

La natura eterogenea degli stimoli subiti da una cellula può indirizzare la stessa verso scelte diverse di modelli di morte da attuare.

La morte cellulare perviene, infatti, oltre che per apoptosi, anche attraverso altri meccanismi, come la necrosi.

L'apoptosi e la necrosi sono manifestazioni morfologicamente e funzionalmente divergenti di uno stesso fenomeno. Solitamente si verificano separatamente, ma vi sono casi di simultaneità. Il sottile confine che le separa, infatti, viene comunemente varcato solo variando le dosi di uno stesso stimolo (effetto dose).

### **Caratteri morfologici delle cellule apoptotiche**

La microscopia ottica e maggiormente quella elettronica hanno permesso di cogliere i parametri salienti che delineano la peculiarità del fenomeno dell'apoptosi.

Durante le primissime fasi di morte apoptotica, caratteristiche tipiche sono la “contrazione” cellulare e la picnosi, ben visibili al microscopio ottico. Le cellule, contraendosi, perdono la loro naturale grandezza; acquisiscono una maggiore densità citoplasmatica e gli organelli sono fortemente addensati.

Con il termine picnosi, invece, si indica una sorta di “contrazione nucleare”, quale conseguenza diretta della condensazione della cromatina, ed è la caratteristica più comune attribuita all'apoptosi.

L'esame istologico con colorazione con ematossilina ed eosina, conferma l'interessamento di cellule singole o piccoli gruppi nel processo apoptotico.

Le cellule apoptotiche appaiono rotondeggianti o vagamente ovali, in quanto perdono i loro contatti con le cellule vicine, fenomeno valido almeno per le cellule che crescono nell'architettura definita di un tessuto solido. Mostrano un

citoplasma fortemente eosinofilo e un nucleo intensamente colorato in viola, con zolle cromatiniche: sono conseguenze dirette delle modifiche morfologiche prima descritte.

La microscopia elettronica bene si presta alla definizione delle caratteristiche subcellulari e delle modifiche pervenute. La picnosi nucleare, ad esempio, interessa inizialmente il materiale genetico periferico, collocato immediatamente al di sotto dell'involucro nucleare, o anche crea zolle uniformemente distribuite.

La membrana plasmatica forma estese evaginazioni, definite «*blebs*». Sono importanti preformazioni da cui si staccheranno frammenti cellulari, attraverso un fenomeno detto di «gemmazione». I frammenti sono i “corpi apoptotici” e consistono di materiale e organelli citoplasmatici fortemente impacchettati. Possono contenere o meno frammenti nucleari.

Ogni componente cellulare mantiene la propria integrità e sono racchiusi da porzioni di membrana plasmatica, che ne evita la fuoriuscita nei liquidi interstiziali. In tal modo, i corpi sono successivamente fagocitati da macrofagi, cellule vicine e degradati all'interno dei fagolisosomi. Tali cellule “spazzine” sono

anche chiamate «*tingible body macrophages*», per la presenza di frammenti nucleari delle stesse cellule apoptotiche inglobate, che sono messi in evidenza come corpi intensamente colorati con varie tecniche di colorazione. Il fenomeno mediato dall'azione macrofagica è alla base dell'assenza di reazioni infiammatorie connesse all'apoptosi, grazie a fattori quali:

- a) le cellule morenti non rilasciano i loro componenti nei tessuti interstiziali circostanti e non mediano, quindi, l'infiammazione;
- b) esse sono facilmente e prontamente fagocitate, prevenendo fenomeni secondari di necrosi;
- c) le cellule fagocitate non inducono la produzione di citochine infiammatorie.

Sebbene l'apoptosi e la necrosi si mostrano come le classiche due facce della stessa "moneta morte", essi restano due processi che presentano delle sostanziali differenze tra loro.

La necrosi è considerata come un processo tossico dove le cellule sono vittime passive, essendo esso stesso un modello di morte energeticamente indipendente.

Nonostante ciò, esiste un filo di congiunzione tra i due processi.

Le evidenze sperimentali indicano che la necrosi e l'apoptosi rappresentano l'espressione morfologica di una rete biochimica in parte condivisa, designata come «*continuum* apoptosi-necrosi». Per esempio, fattori che convertono un processo apoptotico in uno necrotico includono un decremento dell'attivazione delle caspasi cellulari (gli enzimi di maggiore rilievo nell'attivazione e nella progressione della cascata di morte) e la carenza delle concentrazioni di ATP tra le riserve della cellula. Il tipo di tessuto, lo stadio di sviluppo e la natura dello stimolo sono altri fattori che possono influenzare la scelta del programma di morte da attuare.

L'istologia classica difficilmente permette di distinguere con certezza la necrosi dall'apoptosi (come l'uso di coloranti vitali: vedi oltre).

La necrosi è un processo incontrollato e passivo che solitamente colpisce un largo rango di cellule mentre, l'apoptosi, è controllata e dipende dall'apporto dell'energia prodotta dall'apparato biochimico cellulare, e può interessare singole cellule o piccoli gruppi, come già accennato.



Il danno necrotico consta essenzialmente di due meccanismi principali, quali la deplezione energetica e danno diretto alle membrane.

Le cellule necrotiche si rigonfiano; formano vacuoli citoplasmatici; mostrano i sistemi membranosi interni, reticolari e golgiani, molto dilatati.; i mitocondri appaiono rigonfi e con danni alle membrane; i ribosomi sono dissociati nelle loro subunità costituenti; i lisosomi sono rigonfi e collassano; infine la membrana presenta numerose evaginazioni e può rompersi in svariati punti.

Alcuni autori sottolineano la responsabilità della perdita dell'integrità della membrana, così come della degenerazione lisosomiale, nel favorire il rilascio all'esterno del contenuto cellulare e nell'attivare, quindi, i fenomeni infiammatori intimamente connessi alla necrosi e di cui l'apoptosi ne è esente.

### **Aspetti biochimici dell'apoptosi: via intrinseca e via estrinseca**

Le cellule apoptotiche esibiscono un gran numero di modificazioni biochimiche le cui conseguenze dirette sono gli aspetti morfologici già esposti.

La “biochimica apoptotica” include tagli e aggregazioni proteiche, rotture nel DNA e soprattutto l'espressione di sistemi di riconoscimento fagocitico che è uno dei caratteri della cellula apoptotica, come già descritto.

Il fondamento dell'attivazione e della progressione dell'apoptosi stessa risiede nella natura e nella azione di una determinata categoria di proteine, quali le «caspasi». Esse sono delle cistein-proteasi con spiccata specificità per i residui di acido aspartico.

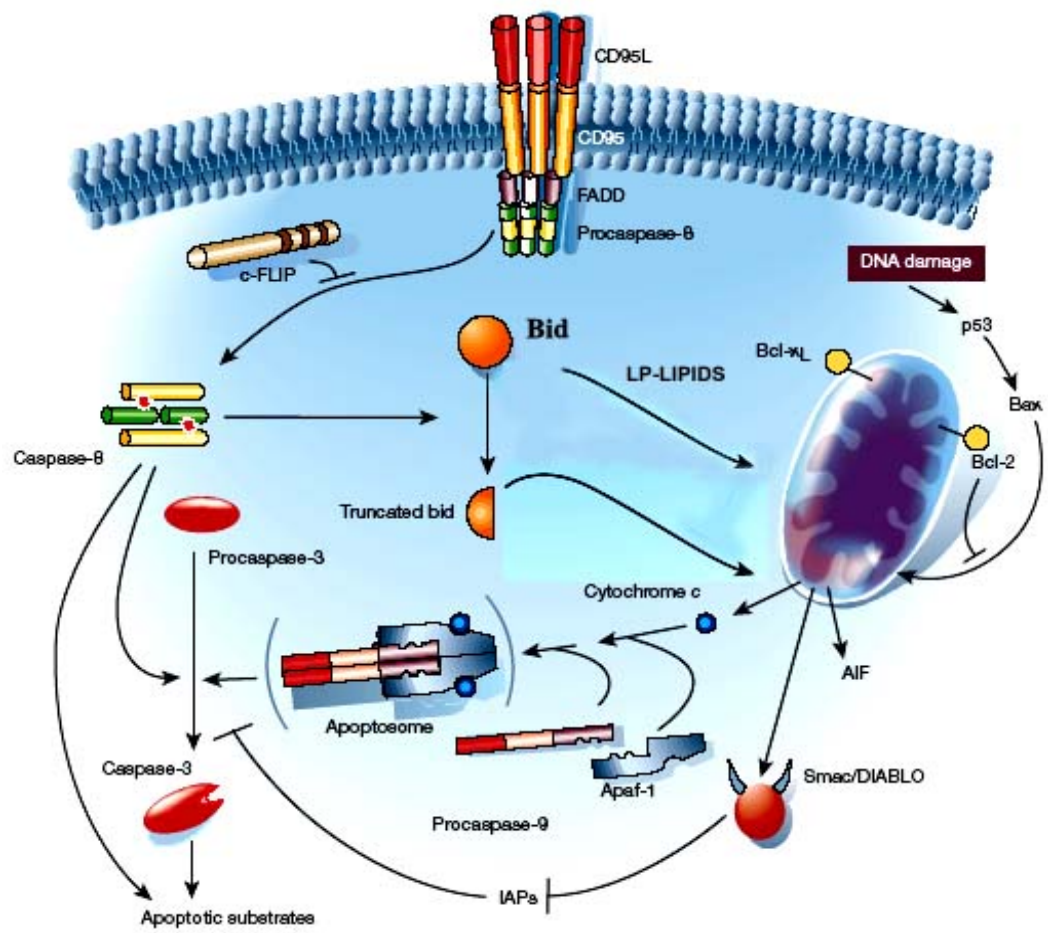
Le caspasi propriamente responsabili dell'attivazione della cascata apoptotica sono dette «iniziatrici» e si distinguono dalle altre, le «esecutrici» che sono il braccio secolare.

Come tutti i processi biologici essenziali, esiste una ridondanza di vie che portano alla apoptosi. Generalmente se ne distinguono due tra le più importanti, distinte come «via intrinseca» e «via estrinseca». Entrambe sono costituite da più

livelli di attivazione/esecuzione, e più “attori molecolari” cellulari ne entrano a far parte. Questo è un importantissimo aspetto che permette la fine regolazione dell’apoptosi e l’eventuale blocco della stessa, essendo comunque un processo reversibile.

Sono stati scoperti, infatti, numerosi inibitori di molti recettori di morte, quale c-FLIP e gli inibitori degli agonisti proteici dell’apoptosi, IAP.

Le concentrazioni relative di induttori ed inibitori dell’apoptosi ne mediano l’eventuale compiersi.



**Fig. 3i:** Schema generale dell'apparato biochimico dell'apoptosi.

VIA ESTRINSECA. Viene così definita la modalità di induzione del processo apoptotico che parte da agenti esterni capaci di interagire con determinati recettori di membrana, comunemente riconosciuti come «recettori di morte». Tra essi si annoverano quelli che meglio caratterizzano il *pathway* estrinseco , quali il recettore FAS (anche denominato CD95 o APO-1/APT) e il recettore TNF-R1, per il *FAS-ligand* e la citochina negativa TNF (*tumor necrosis factor*), rispettivamente. Ulteriori recettori di morte specifici sono DR3, Killer/DR5. Essi sono caratterizzati da una proprietà morfo-funzionale comune, quale una sequenza di 80 aminoacidi nella porzione citoplasmatica della loro struttura, definita DDs (*death domains*) (Peter *et al.*, 2007).

Il legame dei ligandi con i corrispettivi recettori provoca la trasduzione del segnale di morte, attraverso i suddetti domini di morte, e il reclutamento di particolari proteine adattatrici. Tali proteine, attraverso i DEDs (*death effector domains*) causano la formazione di un complesso molecolare che porta all'attivazione delle caspasi iniziatrici.

Una delle proteine adattatrici è FADD (MORT-1), che recluta molte molecole di procaspasi-8, -10 e i relativi regolatori come c-FLIP, in un unico complesso molecolare denominato DISC.

Tali molecole si attivano a caspasi mature attraverso un «meccanismo di induzione per prossimità», ancora oggetto di studio, quale importantissimo strumento di trasduzione del segnale usate dalle cellule.

La caspasi-8 attivata agisce sulla procaspasi-3 inattiva. Essa viene attivata attraverso un taglio proteolitico.

Sotto forma di caspasi-3 attiva, quindi, esplica la sua azione su vari substrati:

- 1) CAD (deossiribonucleasi caspasi-dipendente), che si trova nel citoplasma legata all'inibitore I-CAD (*Inhibitor CAD*);
- 2) lamine nucleari, che regolano l'architettura dell'involucro nucleare;
- 3) proteine citoscheletriche (fodrina, gelsolina), che intervengono nella polimerizzazione degli elementi del citoscheletro;
- 4) poli-ADP-ribosio-polimerasi, che viene inibita.

Come si può bene comprendere la via estrinseca ha molteplici bersagli, quali enzimi che per attivazione diretta o per degradazione dei loro inibitori sono facilitati nella loro azione di degrado del DNA nucleare. Effetto ultimo di questo pattern di attivazione è la formazione del «DNA *laddering*», la rottura del DNA in frammenti di 180-200 bp, che possono essere messi in evidenza con corsa elettroforetica. Il gel mostra, infatti, una successione di bande, a distanza costante, per la presenza di frammenti di dimensioni multiple di un valore fisso. Questo è ritenuto uno tra i primi marcatori per l'apoptosi.

Gli altri enzimi, bersagli della caspasi esecutrice 3, attuano processi che causano le modificazioni morfologiche tipiche dell'apoptosi, per l'attacco diretto al citoscheletro (fodrina e gelsolina) e all'architettura nucleare (lamine).

VIA INTRINSECA. L'induzione dell'apoptosi che prende avvio dall'attivazione di questa via, non parte da stimoli che interagiscono specificamente con recettori di membrana.

Alcuni segnali interni, propri della cellula, attivano tale cascata, in un contesto positivo o negativo, allorquando la morte cellulare si presenti come un

soluzione idonea per il fine ultimo di evitare la trasmissione di alterazioni al genoma, quali cause di possibili trasformazioni neoplastiche, o perché risponda a determinati programmi ontogenetici.

L'assenza di fattori di crescita, l'azione di determinati ormoni, danni al genoma cellulare e l'inefficacia di determinati segnali antiapoptotici, rivestono un ruolo fondamentale nell'attivazione della via intrinseca.

Tale pattern è indotto, in alcuni tipi cellulari, dall'azione della caspasi-8 che, inefficace sull'attivazione della caspasi-3, prende come bersaglio la proteina Bid.

Tale fattore si trova esclusivamente nel citosol e subisce un taglio proteolitico attivante. A tal punto può migrare nel mitocondrio, da cui parte effettivamente la via intrinseca.

Importantissimo è anche il ruolo svolto dalla proteina Bax, indotta da p-53. Questa forma eterodimeri con Bid, che hanno la capacità di permeabilizzare la membrana mitocondriale esterna al passaggio del citocromo c.

Il citocromo c, così rilasciato, diffonde nel citosol, dove forma il complesso sovramolecolare dell'«apoptosoma», legandosi al fattore proteico Apaf-1.



Il compito di questo complesso è quello di attivare la procaspasi-9 a caspasi attiva, in grado di attivare, a sua volta, la procaspasi-3, comune alla via estrinseca.

La proteina Bid, insieme ad altre comunemente definite BH3, hanno un'omologia strutturale nel loro dominio con quelle della famiglia del Bcl-2. Esse raggiungono per prime il mitocondrio e, cooperando con altri membri della famiglia, quali Bax e Bad, mediano il rilascio di fattori proapoptotici, oltre al già citato citocromo c.

Tra le proteine apoptogene ricordiamo: AIF (*apoptosis inducing factor*) e Smac/DIABLO.

La via più importante che media il rilascio di AIF è quella attuata da PARP-1, che normalmente esplica la sua azione enzimatica nella replicazione e nel riparo del DNA, nonché nella regolazione della trascrizione. In risposta a stress tossici per il genoma, l'attività di PARP-1 aumenta al fine di fronteggiarli e preservare l'integrità cellulare. Ma se la loro nefasta azione si prolunga, PARP-1 scatena il rilascio di AIF che, a sua volta, media il rilascio del citocromo c e quindi la serie di eventi già citata. PARP-1 è in grado di attivare anche programmi apoptogeni caspasi-indipendenti.

Il ruolo di PARP-1 nell'induzione dell'apoptosi è confermato da molte evidenze sperimentali condotti su sistemi in cui la sua azione era stata inibita o il gene *parp-1* era stato deleto e in cui derivava la conseguenziale soppressione dei fenomeni apoptotici.

APOPTOSI E RETICOLO ENDOPLASMATICO. L'insieme dei meccanismi che derivano dal sistema UPR, è in grado di condurre la cellula a morte programmata. Quando i disturbi che hanno generato lo stress nel reticolo endoplasmatico non sono opportunamente ripristinati, infatti, la cellula non ha altra possibilità che interrompere il proprio ciclo vitale per evitare l'accumulo di ulteriori danni a livello del reticolo e dell'intero apparato cellulare.

I meccanismi che conducono all'apoptosi indotta da stress del reticolo, non sono stati ancora completamente descritti.

Uno degli elementi distintivi di tale processo, e destinato a divenire caposaldo dello stesso, è l'attivazione di una specifica cisteina proteasi, denominata caspasi 12.

La caspasi-12 e reticolo endoplasmatico sono intimamente connessi così come si evince da molte evidenze sperimentali che dimostrano, come primo fondamentale elemento, la loro correlazione spaziale: analisi di *western blotting* dimostrano che il sito di azione dell'enzima è proprio a livello della frazione microsomiale ottenuta dai lisati cellulari analizzati. In particolare, dalle indagini immunoistochimiche emerge che l'enzima si localizza a livello delle membrane dell'involucro nucleare, con uno schema simile allo stesso fattore BiP, notoriamente localizzato nel reticolo, in cellule L929 ed HeLa (Nakagawa *et al.*, 2000).

Ulteriori lavori dimostrano anche l'associazione funzionale tra reticolo endoplasmatico e caspasi-12: lo stress del reticolo, in condizioni di mancanza di recupero, conduce al suicidio cellulare correlato all'aumento dell'attività della caspasi-12 sia *in vivo* (Cui *et al.*, 2013) che *in vitro* (Liu *et al.*, 2013).

I meccanismi alla base dell'attivazione della caspasi-12 sono attualmente oggetto di studio, i quali, confermano la relazione con il reticolo e il ruolo dello ione  $\text{Ca}^{2+}$ ; (Nakagawa e Yuan, 2000; Łopatniuk & Witkowski, 2011).

All'attivazione della caspasi-12 segue, solitamente, quella di altre procaspasi, a causa dell'azione proteolitica della stessa esplicita nei loro confronti.

Attraverso il taglio e l'attivazione della procaspasi-9, che attiverà a sua volta la procaspasi-3 (Morishima *et al.*, 2002; Szegedi e Samali, 2003), i sistemi di morte programmata della cellula sono quindi interconnessi proprio a livello della caspasi-12. La caspasi-9, impegnata nel pathway intrinseco, subisce un'attivazione da caspasi-12 indipendente dall'azione dell'apoptosoma, ovvero dal citocromo c di origine mitocondriale (Rao *et al.*, 2002).

## **SCOPO DELLA TESI**

### **Finalità del lavoro**

Le precedenti osservazioni dei gruppi di ricerca dell' ex Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, attuale C.R.A-NUT, in collaborazione coi quali è stato condotto il presente lavoro, hanno dimostrato che alcune isoforme di tocotrienolo e il TRF (*tocotrienols rich fraction*) estratti dall'olio di palma, sono in grado di modulare l'espressione di geni coinvolti nell'apoptosi.

Il complesso che si forma in seguito all'interazione dei tocotrienoli con l'isoforma  $\beta$ - del recettore degli estrogeni migra nel nucleo e attiva un percorso che induce apoptosi. Tale meccanismo è stato osservato in diverse linee cellulari tumorali umane.

Al fine di valutare se i tocotrienoli siano anche in grado di attivare i percorsi apoptotici indipendentemente dalla loro interazione con la forma  $\beta$ - del recettore degli estrogeni, nel corso della sperimentazione sono state adoperate le cellule della linea HeLa, che notoriamente non esprimono recettori per gli estrogeni. Inaspettatamente è stata osservata un'analogia attivazione del percorso apoptotico.

Attraverso l'utilizzo di piattaforme *gene array* e mediante un'analisi bioinformatica di *data interrogation* è stato ipotizzato che i tocotrienoli potrebbero indurre apoptosi attivando un'alterazione del reticolo endoplasmatico (stress del reticolo endoplasmatico).

Lo scopo del lavoro presentato è stato, pertanto, la valutazione e la descrizione dei meccanismi molecolari coinvolti nello stress del RE che mediano lo *switch* funzionale della cellula, per il quale si verifica l'attivazione di determinati *alarm genes* implicati nell'induzione dell'apoptosi a scapito degli *adaptation genes* opportunamente attivati in fase di ripristino dell'omeostasi del reticolo endoplasmatico e dell'intera cellula o dell'adattamento della stessa nelle protratte condizioni di stress.

## MATERIALI E METODI



### **Linea cellulare e trattamenti**

La linea cellulare prescelta per il trattamento sperimentale è la HeLa cells, che funge da “controllo negativo”, perché notoriamente priva di recettori classici per gli estrogeni ed è stata ottenuta da American Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA).

La linea è stata mantenuta in *DMEM high glucose (Dulbecco's modified eagl's medium)*.

Il terreno di coltura, ad elevata concentrazione di glucosio, è stato addizionato con:

- 10% di FBS (*foetal bovine serum*) (Sigma-Alrich);
- 2 mM di glutammina (EuroClone);
- 1% di mix antibiotico Pen/Strep (EuroClone);
- 1% di amminoacidi non essenziali (Sigma-Alrich)

Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75 ml fino ad una confluenza pari al 70-90% e mantenute in incubatore ad atmosfera controllata e umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> e ad una temperatura di 37°C.

Raggiunta i valori di confluenza, prima di iniziare i trattamenti, le cellule sono state trasferite per 72 ore in mezzo privo di siero (-FBS), al fine di sincronizzare tutte le cellule in fase G1/G0 del ciclo cellulare.

Al termine del processo di sincronizzazione, le cellule sono state staccate dal fondo delle fiasche di coltura grazie a un trattamento con tripsina, per la risospensione. Sono state, quindi, trasferite nuovamente in terreno DMEM con l'aggiunta di siero (+FBS).

Le cellule così ottenute e trattate sono state opportunamente suddivise per le fasi sperimentali successive.

Per l'estrazione dell'RNA, le cellule sono state opportunamente trasferite in piastre multiwell costituite da sei pozzetti. In ogni "alloggio" sono state introdotte cellule ad una concentrazione pari a  $3 \cdot 10^5$ /pozzetto.

Per l'estrazione delle proteine, le cellule sono state trasferite in capsule di Petri, contenenti ognuna una concentrazione iniziale pari a  $1.5 \cdot 10^6$  cellule/capsula.

Le cellule così trasferite sono state sottoposte ai trattamenti.

I mezzi di coltura in cui erano contenute le cellule sono stati addizionati con le diverse forme di tocotrienoli purificati e la TRF (*tocotrienols rich fraction*),

estratta dall'olio di palma e purificata (Sime Darby Plantation). Tale frazione contiene il 32% di  $\alpha$ -tocoferoli, 25% di  $\alpha$ -tocotrienolo, 29% di  $\gamma$ -tocotrienolo e il 14% di  $\delta$ -tocotrienolo.

Le miscele per i trattamenti sono state ottenute con l'uso di DMSO od etanolo come solventi che sono stati, quindi, aggiunti puri al terreno delle cellule che rappresentano il controllo.

Le concentrazioni dei vari trattamenti sono state stabilite in base a quelle già adoperate e riportate in altri lavori (Comitato *et al.*, 2009; Comitato *et al.*, 2010), al fine di standardizzare anche il presente studio con essi, di cui si riportano i valori nella Tab. 1mm.

Le incubazioni con le molecole trattanti hanno avuto una durata di 24 ore.

Al termine di tale periodo, le cellule sono state allontanate dal mezzo di coltura e hanno subito lavaggio in PBS e convogliate alle fasi sperimentali successive, quali l'estrazione di RNA e proteine.

Una delle variazioni del protocollo sperimentale – opportunamente specificate in seguito nelle varie fasi – riguarda il pretrattamento delle cellule con

ICI-182.780  $10^{-5}$  M in etanolo – quale inibitore per i recettori per gli estrogeni – della durata di 30 minuti, prima della somministrazione delle molecole di tococromanoli.

A tale scopo, le cellule sono state incubate in piastre multiwell in una concentrazione di  $3 \cdot 10^5$ /pozzetto.

T3s		Concentrazioni		
<b><math>\alpha</math>-tocotrienolo</b>	5 $\mu\text{g/mL}$			
<b><math>\gamma</math>-tocotrienolo</b>	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	
<b><math>\delta</math>-tocotrienolo</b>	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	
<b><math>\alpha</math>-tocoferolo</b>	5 $\mu\text{g/mL}$			
<b>TRF</b>	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	

**Tab. 1mm** : Trattamenti e concentrazioni.

### **DNA laddering**

Il protocollo per l'estrazione è stato adattato da Gooch e Yee () con alcune variazioni già apportate e descritte in altri studi (Comitatto et al., 2010).

Il DNA estratto è stato caricato su un gel all'1.5% di agarosio per una corsa elettroforetica.

Per la successiva visualizzazione nella composizione del gel è stato aggiunto il bromuro di etidio, quale intercalante delle basi azotate del DNA, che emette luce quando opportunamente illuminato da una fonte di UV, rendendo visibili le bande del materiale genetico durante l'elettroforesi.

L'osservazione e l'acquisizione delle immagini è stata condotta al sistema UVipro Bronze (UVITEC, Cambridge, UK).

## Microscopia a fluorescenza

Nella serie di esperimenti ora presentata, i campioni di cellule HeLa analizzati sono stati quelli derivanti dal trattamento con TRF e  $\gamma$ -T3.

Inoltre è stato allestito un ulteriore trattamento con *carbacol*. Esso è una sostanza che promuove il rilascio di ioni calcio intracellulare, per cui tali campioni hanno rappresentato il controllo positivo per tale fase sperimentale.

I campioni cellulari sono stati incubati con le molecole sopra elencate per trattamenti della durata di 15 minuti, quale spazio temporale utile per il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$ .

Al termine dell'incubazione, le cellule hanno subito tre successivi lavaggi in HBSS+ (*Hanks Balanced Salt Solution*).

Al termine dei lavaggi, le cellule sono state nuovamente incubate con Fluo4 AM (Acetossimetil-estere), quale fluoroforo che lega gli ioni calcio mobilizzati, per 45 minuti.

Successivamente è stato, quindi, allontanato l'eccesso di fluoroforo non

legato, le cellule hanno subito tre lavaggi successivi in HBSS+ ed incubate nuovamente in mezzo di coltura privo di siero a temperatura ambiente.

Le cellule sono state fissate, per con paraformaldeide al 4%, per 10 minuti e a temperatura ambiente, con PFA buffer così costituito:

- 3% di PFA (paraformaldehyde);
- PBS;
- 0.5% di Triton X-100.

Al termine, le cellule sono state ulteriormente lavate per due volte in PBS e colorate con DAPI per contrastare i nuclei.

Le cellule sono state, quindi, osservate a microscopio a fluorescenza, Zeiss Axioskop II (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), con l'uso di appropriati filtri. Le immagini ottenute sono state processate con il *software* SPOT.



### Calcium Assay

Le concentrazioni di ioni calcio liberi sono state determinate con il kit Fluo-4 NW Calcium Assay, secondo le istruzioni del produttore.

Le cellule sono state incubate in piastre multiwell a 96 pozzetti con una concentrazione di  $4 \cdot 10^4$  cellule/pozzetto. In ognuno degli alloggi, il mezzo è stato sostituito con 100  $\mu$ L di *dye loading solution*. Le piastre sono state incubate per 60 minuti a 37°C in atmosfera umidificate e con 5% di CO<sup>2</sup>.

Al termine della prima incubazione, sono stati aggiunti altri 50  $\mu$ L di *dye loading solution 2X* in ogni pozzetto e re incubati a 37°C per 45 minuti.

Sono stati quindi aggiunte le molecole per i trattamenti TRF,  $\alpha$ -TP,  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3 in una concentrazione di 10  $\mu$ g/mL, per una durata totale di 15 minuti.

Al termine dei trattamenti, è stata valutata la fluorescenza (eccitazione a 494 nm ed emissione a 516 nm) al Tecanfluorometro (TECAN Infinite ® 200 PRO).

### **Analisi dei microarray**

Attraverso l'attuazione di esperimenti di *microarray*, è stato possibile caratterizzare i profili di espressione fenotipica.

Tale tecnologia permette di effettuare valutazioni di tipo quantitativo dei livelli di espressione dei prodotti di trascrizione del genoma, attraverso la retrotrascrizione ed ibridazione di campioni di RNA su chip di silicio. Questi possono contenere sonde di DNA corrispondenti a specifiche porzioni della sequenza nucleotidica contenuta nella regione 3'-UTR di geni noti.

Attraverso un esperimento in triplicato, le cellule HeLa sono state trattate con le diverse forme di tocotrienoli per 24 ore e confrontate con un controllo che non ha subito trattamenti. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

I campioni di RNA estratti sono stati inviati al *Service XS BV* (Leiden, The Netherlands), dove sono stati opportunamente processati secondo i protocolli *Affymetrix*.

Dai campioni così ottenuti, sono stati estratti 2 µg di RNA totale di alta qualità, sono stati usati con i reagenti *Affymetrix Eukaryotic One-Cycle Target*

*Labeling and Control* per generare cDNA legato a biotina. Il cDNA è stato, quindi, ibridato al *NuGOAffymetrix Human Genechip* NuGO\_Hs1a520180, opportunamente disegnato dalla NuGO (*NutrigenomicsOrganization*) e che consiste di 23'941 geni differenti, di cui 71 di controllo.

I *files* di intensità cellulare per ogni *GeneChip* processato sono stati generati usando il software *Command Console*.

Per ogni condizione sperimentale sono stati generati tre replicati biologici. L'analisi statistica dei *Microarray* è stata attuata usando il pacchetto *oneChannel1GUI R*

I dati di intensità del segnale di ogni campione sono stati normalizzati attraverso l'uso della metodica GCRMA così come le correzioni dei “rumori di fondo”, e i geni che hanno subito una variazione di espressione al termine dei vari trattamenti sono stati identificati con l'analisi LIMMA, selezionando solo quei geni con una FC (*Fold Change*) trattamenti vs controlli di almeno 0.5 e una soglia del valore  $p > 0.05$ .

Infine, sono stati selezionati alcuni geni per i quali è stata rilevata un'*up-regulation* o una *down-regulation* dalle analisi dei *microarray*, per le successive

validazioni attraverso l'applicazione della RT-qPCR.

.

### **Analisi dei meccanismi**

I geni espressi in maniera differenziata sono stati ulteriormente analizzati con valutazioni statistiche di arricchimento dei BP (*biological processes*) e dei CC (*cellular components*) annotati in *Gene Ontology*, utilizzando il web server DAVID. I processi biologici sono stati identificati in accordo ad un valore p inferiore a 0.05.

Questa analisi, negli esperimenti condotti sulle HeLa, ha prodotto:

- 41 BP e 13 CC, rappresentati nei geni indotti dal  $\gamma$ -T3;
- 42 BP e 10 CC, rappresentati nei geni indotti dal  $\delta$ -T3;
- 6 BP e 10 CC, rappresentati nei geni indotti dall' $\alpha$ -T3.

Negli esperimenti sulle cellule della linea MCF-7, l'analisi ha prodotto 19 BP e 18 CC, rappresentati nei geni indotti dal  $\gamma$ -T3.

I BP e i CC indotti dal  $\gamma$ -T3 nelle cellule HeLa ed MCF-7 sono stati confrontati con il pacchetto *GOSim*, utilizzando il metodo *Resnik* per misurare la loro somiglianza “semantica”. Le distanze di somiglianza ottenute sono state raggruppate (*clustering*) con il metodo *Ward* ed il numero di *cluster* usati per

identificare i gruppi di termini simili è stato determinato scegliendo quelli che producono il miglior *silhouette score*.

Un'analisi simile è stata condotta per comparare i termini rappresentati (BP e CC) tra i vari trattamenti con i tocotrienoli sulle HeLa cells.

La determinazione del numero di geni – la cui espressione è correlata allo stress del reticolo endoplasmatico e che è stata indotta dai trattamenti con tocotrienoli – è stata effettuata incrociando le liste ottenute dall'analisi *microarray* con le annotazioni derivanti dai *databases Uniprot* e *Pubmed*, attraverso l'uso dell'applicazione *Agilent literature search* del software *Cytoscape* (Lopes *et al.*, 2010), ricercando 1000 articoli con le parole chiavi “*endoplasmic reticulum stress*” e “*homo sapiens*”.

## **Estrazione dell'RNA**

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il kit *RNeasy Plus* (QIAGEN), in accordo con il protocollo fornito.

Al termine delle 24 ore di trattamento con le molecole attive, le cellule sono state lisate per mezzo del tampone definito RTL, contenente guanidina tiocianato come agente denaturante.

Il tampone RTL fornisce le condizioni chimiche necessarie allo svolgimento della lisi delle cellule, ma impedisce l'attività delle RNAsi, che digerirebbero le molecole di interesse.

Il lisato è stato trasferito in una colonnina *gDna Eliminator*, azione necessaria per l'eliminazione del DNA che interferirebbe col saggio.

All'eluato ottenuto dal precedente passaggio, è stato aggiunto etanolo al 70% per favorire il legame dell'RNA alla colonnina *RNeasy*.

Nei passaggi successivi è stata effettuata una serie di lavaggi per permettere l'eliminazione di elementi contaminanti come, ad esempio, residui di DNA.

Il campione di RNA ottenuto è stato quindi diluito con H<sub>2</sub>O RNasi-*free*.

Inoltre, esso è stato preservato ad una temperatura di 20°C, fino all'esecuzione delle successive fasi sperimentali.

Per la determinazione della concentrazione dell'RNA nel campione ottenuto è stato adoperato *Agilent RNA 6000 Nano Kit*, come da protocollo fornito dal produttore.



## Real Time PCR

L'RNA totale e l'analisi di Real Time PCR sono stati condotti secondo i protocolli ampiamente descritti da Comitato e collaboratori in precedenti lavori (Comitato *et al.*, 2010).

La fase preliminare l'attuazione dell'analisi comparativa della RT-PCR consiste nella determinazione della concentrazione di RNA alla quale avviene l'analisi stessa.

A tale scopo è stato utilizzato il kit *Super Script Platinum SYBR Green One-Step* (Invitrogen).

Per l'amplificazione è stato utilizzato il macchinario *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR*.

La reazione è stata condotta in duplicato impiegando 5  $\mu$ L del campione di RNA derivante da ogni trattamento e 10  $\mu$ L di miscela, per un volume finale di reazione di 15  $\mu$ L. La miscela di reazione è stata così costituita:

- 7.5  $\mu$ L di 2x AB mix;
- 0.12  $\mu$ L di 125x RT mix;

- 0.6  $\mu$ L di *primer* (F + R 10 mM);
- 1.78  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O RNasi-free.

Il metodo *sybr green with melt curve* prevede 40 cicli consistenti, a loro volta, fasi successive di *denaturation/annealing/duplication*. I cicli si svolgono secondo il seguente protocollo termico:

- *Holding stage* a 48°C per 30 minuti; 95°C per 10 minuti;
- *Cycling* a 95°C per 15 secondi; 60°C per 1 minuto; 95°C per 15 secondi; 60° per 15 secondi.

Le differenze quantitative nel cDNA target dei vari campioni, sono state determinate usando il modello matematico di Pfaffl (Pfaffl, 2001), in cui è stato determinato il rapporto di espressione per ogni campione, secondo la formula

$$NQR = \frac{E_{target}^{\Delta Ct_{target}}}{E_{riferimento}^{\Delta Ct_{riferimento}}}$$

dove:

- NQR = Quantificazione Relativa Normalizzata;
- E = Efficienza di amplificazione;
- $\Delta Ct = Ct_{(\beta\text{-actin})} - Ct_{(target)}$ .

I risultati ottenuti sono stati trasformati in valori logaritmici in base 2 per una distribuzione simmetrica.

L'efficienza di amplificazione di ogni set di *primer*, indicati nella formula precedente, è stata calcolata dalla *slope* (coefficiente) di una curva standard di amplificazione - secondo gli assi log  $\mu\text{L}$  cDNA/reazione vs valori di Ct di almeno 4 ordini di magnitudo – secondo la formula:

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{\text{slope}}\right)}.$$

Le efficienze dei *primers* impiegati nel saggio sono le seguenti:

- $E_{\beta\text{-actin}} = 2.15$ ;
- $E_{\text{mic}} = 2.03$ ;
- $E_{\text{cathepsin-D}} = 2.55$
- $E_{\text{chop}} = 1.94$
- $E_{\text{xbp-1}} = 2.19$ .

PRIMERS. I geni esaminati nell'analisi RT-PCR sono stati XBP-1 e CHOP, per i quali sono stati utilizzati le coppie di *primers* F + R (*forward and*

*reverse*) indicati nella seguente tabella.

<b>Reverse XBP-1</b>	<b>Forward XBP-1</b>
5'-GCACGTAGTCTGAGTGCTGCGG-3'	5'-GGGATGGATGCCCTGGTTGCT-3'
<b>Reverse CHOP</b>	<b>Forward CHOP</b>
5'-CCACACCTGAAAGCAGA-3'	5'-TCATACCAGGCTTCCAG-3'

**Tab. 2mm:** Sequenze dei *primers* utilizzati nell'analisi RT-PCR.

### **Retrotrascrizione, amplificazione e digestione di XBP-1**

L'RNA estratto è stato retrotrascritto in cDNA e successivamente è stato amplificato utilizzando il kit *SuperScript III One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq DNA Polymerase* (Invitrogen).

Il kit adoperato ha il vantaggio di eseguire una retrotrascrizione ed una successiva amplificazione in un solo passaggio utilizzando un *primer* specifico.

Nel caso presentato è stato utilizzato il *primer* per l'amplificazione di XBP-1.

La reazione è stata condotta in un volume finale di 50 µl costituito da:

- 500 ng/µl dell'RNA estratto;
- 2 µl di SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen);
- 25 µl di 2X Reaction Mix;
- 2 µl di primer (F + R);
- 16 µl H<sub>2</sub>O RNasi-*free*.

---

**XBP-1**

**Forward**    5'-AAACAGAGCAGCAGCTCAGACTGC-3'

**Reverse**    5'-TACTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3'

---

**Tab. 3mm:** Sequenze dei primers di XBP1.

Il *termocycler GeneAmp PCR System 9700* è stato impostato secondo il seguente protocollo:

- un ciclo di *cDNA synthesis* della durata di 15-30 minuti ad una temperatura di 45-60°C;
- un ciclo di *denaturation* della durata di 2 minuti ad una temperatura di 94°C;
- 40 cicli di *PCR amplification* della durata di 15 secondi ad una temperatura di 94°C; un ciclo della durata di 30 secondi ad una temperatura di 55-65°C; un ciclo della durata di 1 minuto ad una temperatura di 68°C.

I cDNA delle reazioni di retrotrascrizione e di amplificazione così ottenuti, sono stati utilizzati nella successiva fase, quale la digestione con l'enzima di restrizione Pst1.

La reazione è stata condotta con una miscela di reazione così composta:

- 20 µL di cDNA;
- 5 µL di H Buffer 10x;
- 1 µL di Pst1;



- 1.5  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O RNasi-free.

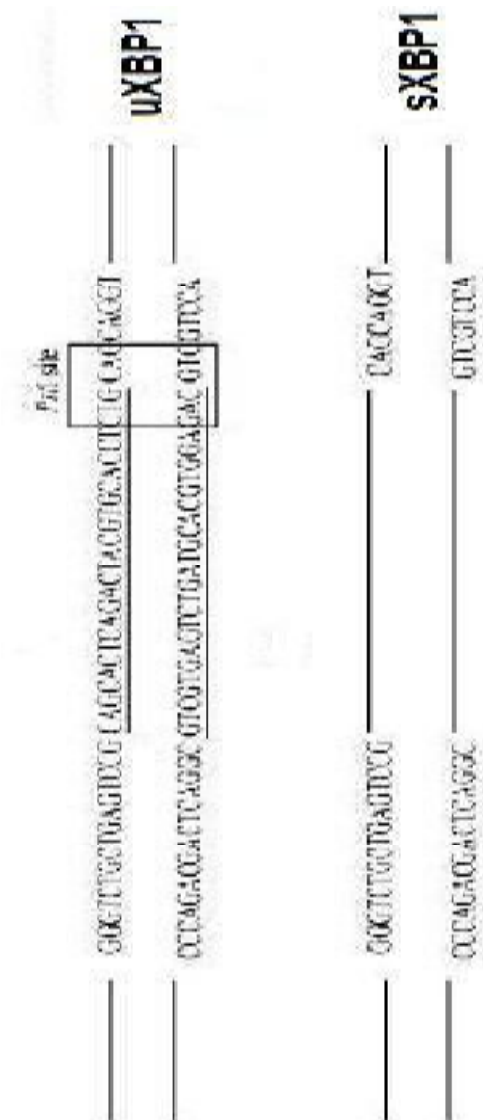
La reazione di digestione è stata lasciata avvenire a 37°C per un'ora.

Al termine del periodo di incubazione, la miscela di reazione è stata caricata su gel di agarosio al 2% per la separazione dei prodotti con elettroforesi a 110V per circa due ore.

La fig. mostra le due forme alternative di XBP1:

- uXBP1, RNA messaggero che non subisce *splicing* e contenente, quindi l'introne;
- sXBP1, RNA messaggero che deriva dal processo di *splicing* e privo, quindi, dell'introne.

La forma non processata, uXBP1, dell'mRNA presenta un sito di taglio per l'enzima di restrizione Pst1, che invece non è più presente dopo l'allontanamento dell'introne dalla sequenza ad opera dello *splicing*.



**Fig. 1mm:** Forme alternative dell'mRNA di *xbp-1*.

### **Estrazione proteica e western blot**

I campioni cellulari impiegati per l'estrazione di proteine, sono stati sottoposti a lisi.

Il reagente adoperato è il RIPA *buffer*, costituita dallo stock di JS *solution*:

- 2 mL di Hepes 1M pH 7.5;
- 1.5 mL NaCl 5M;
- 300  $\mu$ L di glicerolo;
- 500  $\mu$ L di Triton x-100;
- 7.5  $\mu$ L  $MgCl_2$ ;
- 2,5 mL di EGTA 0.1M;
- $H_2O$  bidistillata.

La soluzione ha un volume finale di 50 mL.

La JS *solution* è stata opportunamente completata con:

- 500  $\mu$ L di sodio pirofosfato;
- 25  $\mu$ L di miscela anti-proteasi (Sigma Aldrich);
- $H_2O$  bidistillata.

Il volume finale di reazione è pari a 2.5 mL.

Le cellule sono state lisate con 500 µL di RIPA buffer. Al termine del processo, i campioni sono stati centrifugati a 13'000 rpm per 30 minuti ad una temperatura di 4°C.

Conclusa la centrifugazione e raccolto il surnatante, ne è stata determinata la concentrazione di proteine attraverso l'applicazione del metodo Bradford, in accordo con il protocollo fornito dal produttore.

WESTERN BLOT. Il campione proteico ottenuto dalla precedente fase di estrazione è stato sottoposto ad un'elettroforesi su gel di poliacrilamide in ambiente denaturante (SDS-PAGE). In tal modo le proteine contenute sono state separate e successivamente trasferite su membrana mediante *electroblotting*.

La corsa elettroforetica delle proteine viene condotta attraverso due gel di differente composizione, al fine di ottenere una separazione preferenziale delle stesse.

Lo *stacking gel* (gel d'impacchettamento) permette, quando opportunamente attraversato dalla corrente, il compattamento delle proteine del

campione durante l'elettroforesi stessa.

Tale gel ha una composizione standard in acrilamide pari al 4% ed è così composto:

- Acrilamide 40%;
- TRIS-HCl 0.5M, pH 6.8;
- SDS 10%;
- TEMED 10%;
- APS 10%;
- H<sub>2</sub>O bidistillata.

Il *resolving gel* (gel di separazione) permette la separazione delle proteine del campione in base al loro peso molecolare durante la loro corsa elettroforetica.

La sua composizione in acrilamide è diversificata in ogni occasione sperimentale, in base al peso molecolare delle proteine oggetto di studio.

Il gel è così composto:

- Acrilamide 40%;
- TRIS-HCL 1.5M, pH 8.8;
- SDS 10%

- APS 10%;
- TEMED 10%;
- H<sub>2</sub>O bidistillata.

L'allestimento dei gel per l'elettroforesi consiste nel creare, in sequenza, due strati sovrapposti e a contatto dei due differenti gel sopra descritti.

A tal fine, tra i vetrini impiegati per determinare la forma dei gel, è stato colato il *resolving gel* ed è stato lasciato polimerizzare.

In una fase successiva viene colato lo *stacking gel*, all'interno del quale vengono allocati i pettini specifici per la creazione dei pozzetti, dove saranno caricati i campioni proteici. Viene lasciata avvenire la polimerizzazione.

I vetrini contenenti i gel sono adagiati nella camera per la corsa elettroforetica, che sarà opportunamente riempita con la soluzione *running* 1x. Essa deriva da uno stock 10x così costituito:

- TRIS 250 mM;
- Glicina 1.93 mM;
- SDS 10%.

Agli elettrodi della camera elettroforetica viene applicata una corrente a

voltaggio costante, pari a 100V, per una corsa della durata di circa un'ora.

Al termine dell'elettroforesi le proteine saranno separate all'interno del gel in base al loro peso molecolare per l'impiego di condizioni denaturanti (SDS) per le stesse. Conclusa la corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite dal gel alle membrane, di nitrocellulosa o polivinildenfloruro (PVDF).

I vetrini sono stati estratti dalla camera elettroforetica, sono stati aperti con manovre caute, al fine di preservare l'integrità del gel. Recuperato quest'ultimo, è stato trasferito nel tampone di trasferimento, derivante da uno stock 5X così costituito:

- TRIS 125 mM;
- Glicina 0.96 mM.

Per l'utilizzo, il tampone di trasferimento è stato utilizzato ad una concentrazione 1X a cui sono stati aggiunti:

- 20% di metanolo;
- H<sub>2</sub>O bidistillata, fino a volume.

Grazie all'allocazione dei gel in un determinato sistema e l'applicazione di corrente elettrica si ottiene il trasferimento delle proteine sulle membrane, per i

successivi saggi immunologici.

Il sistema di trasferimento consta di due supporti di plastica, tra cui vengono posti, in sequenza, i seguenti strati, elencati nell'ordine dall'anodo al catodo:

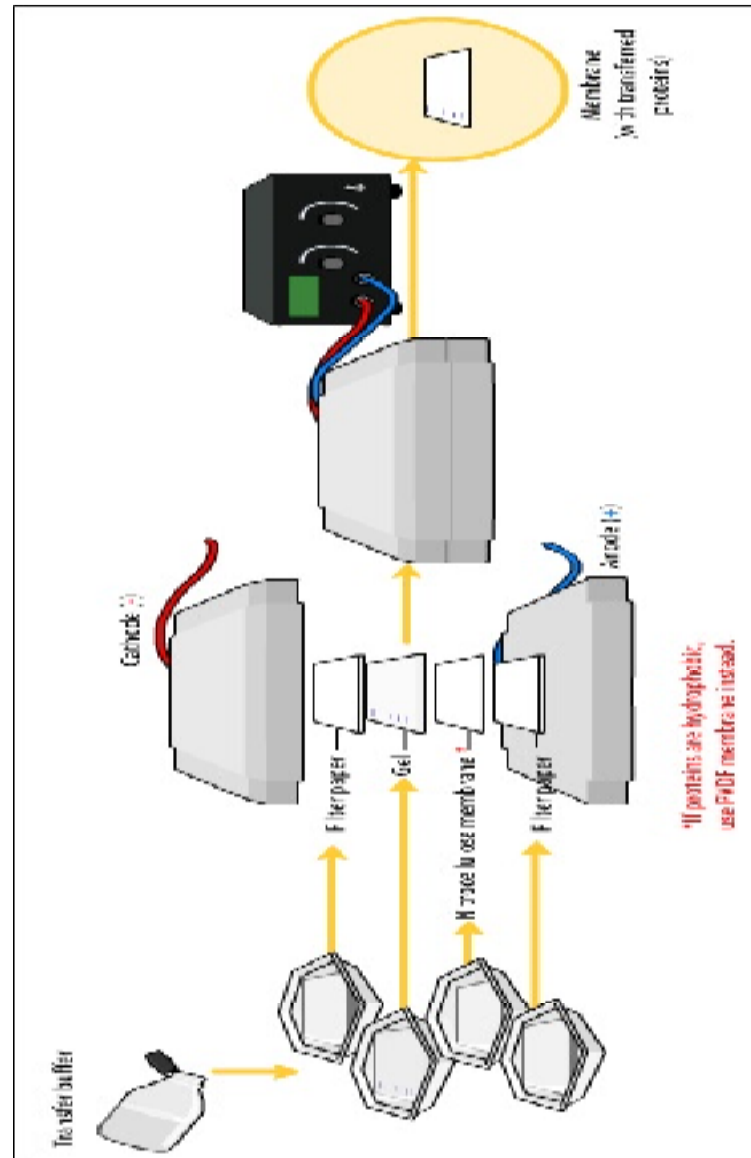
- uno strato poroso (spugnetta);
- strato di carta assorbente delle dimensioni del gel;
- gel elettroforetico;
- membrana di PVDF;
- strato di carta assorbente delle dimensioni del gel;
- uno strato poroso (spugnetta).

Dopo l'allestimento del sistema sopra descritto, è cura dell'operatore allontanare qualsiasi camera d'aria formatasi durante la sovrapposizione dei vari strati, al fine di non compromettere il buon trasferimento delle proteine dal gel alle membrane.

Il sistema così allestito è stato alloggiato in un'apposita camera di trasferimento, alla quale viene applicata una corrente elettrica di 50V.

Il trasferimento è stato condotto ad una temperatura di 4°C, *overnight*.





**Fig. 2mm:** Schema del processo di trasferimento ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

La membrana – con il carico delle proteine ottenuta nella fase di trasferimento – è stata incubata in una soluzione di latte scremato in polvere al 5%, disciolto in T-PBS, così costituito:

- pasticche Dulbecco A *oxid* per PBS;
- Tween-20 0.1%
- H<sub>2</sub>O bidistillata.

L'incubazione avviene su un piano basculante e ha avuto la durata di un'ora.

La soluzione di anticorpo primario per il saggio immunologico è stata preparata sciogliendolo in una miscela di latte scremato in polvere al 5%, come precedentemente descritta. È stata, quindi, aggiunta al sistema precedente in cui era stata incubata la membrana.

L'incubazione dell'anticorpo primario è avvenuta anch'essa su un piano basculante, ad una temperatura di 4°C e per una notte intera.

Al termine, l'anticorpo primario in eccesso è stato allontanato con tre lavaggi successivi con T-PBS.

Il secondo passaggio ha previsto l'introduzione dell'anticorpo secondario,

preparato anch'esso in una soluzione di latte conforme al passaggio precedente.

L'incubazione dell'anticorpo secondario è avvenuta su un piano basculante a temperatura ambiente, e ha avuto la durata di un'ora.

Nella seguente tabella sono riportati gli anticorpi impiegati e le relative diluizioni (*ER Protein Ab Sampler Kit Cell Signalling*).

	Ab primario	Ab secondario
ATF6	1:1000	1:5000 antirabbit
IRE1 $\alpha$	1:1000	1:2000 antirabbit
PERK	1:1000	1:2000 antirabbit
Tubulina	1:1000	1:5000 antimouse

**Tab. 4mm:** Anticorpi e diluizioni utilizzati (ER Protein Ab Sampler Kit Cell Signalling).

Al termine dell'incubazione con l'anticorpo secondario, le membrane sono state rilavate per tre volte in T-PBS.

La membrana è stata, quindi, preparata per l'acquisizione delle immagini in chemiluminescenza. A tal fine, è stato adoperato il kit ECL Plus *Western blot detection system GE Healthcare*, per la preparazione della seguente soluzione di reazione:

- 2 mL di luminolo;
- 50  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La soluzione è stata aggiunta sulle membrane e lasciate agire, in agitazione, per 5 minuti.

Al termine di tale fase si è proceduto all'acquisizione dell'immagine tramite LAS4000 *ImageQuant*.

### **Analisi dell'attività caspica**

Per la determinazione dell'attività delle caspasi-8, -10 e -12 è stato adoperato il *Biovision kit* (Biovision, Lyon, France) in accordo con le istruzioni fornite dal produttore.

In questo protocollo i campioni cellulari sono stati allestiti secondo il protocollo già esposto all'inizio di questo capitolo. Le cellule, contenute in capsule Petri in una concentrazione iniziale pari a  $3 \cdot 10^6$ /capsula, sono state sottoposte a trattamenti con le diverse forme di tocotrienoli, della durata di 12 ore. Inoltre è stato allestito anche un trattamento ulteriore con TM (tunicamicina) con durata di 4 ore.

Nella tabella seguente sono riportate le concentrazioni dei trattamenti allestiti.

<b><math>\alpha</math>-tocoferolo</b>	10 $\mu\text{g/mL}$
<b><math>\gamma</math>-tocotrienolo</b>	10 $\mu\text{g/mL}$
<b><math>\delta</math>-tocotrienolo</b>	10 $\mu\text{g/mL}$
<b>TRF</b>	10 $\mu\text{g/mL}$
<b>Tunicamicina (TM)</b>	5 $\mu\text{g/mL}$

**Tab. 5mm:** Trattamenti e concentrazioni per la determinazione dell'attività caspasica.

Le cellule HeLa – derivanti dai trattamenti appena descritti – sono state centrifugate a 12000 rpm per 5 minuti, risospese in 50 $\mu$ L di *Cell Lysis Buffer* (Biovision) ed incubate in ghiaccio per 20 minuti.

Dopo la reazione di lisi, i campioni sono centrifugati nuovamente a 12000 rpm per 5 minuti, al fine di recuperare il surnatante contenente le proteine, la cui concentrazione è stata determinata con l'applicazione del metodo Bradford (Biorad) e successiva analisi spettrofotometrica al *Tecan Magellan*.

Le proteine sono state portate ad una concentrazione di 300  $\mu$ g/ $\mu$ L in un volume finale di 50  $\mu$ L.

Ad ogni campione sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di *reaction buffer* 2X, fino ad arrivare ad un volume finale di 100  $\mu$ L.

Le miscele (campioni + *reaction buffer*) sono state trasferite in piastre multiwell da 96 pozzetti. Ad ognuna sono stati aggiunti 5  $\mu$ L di substrato specifico per ogni caspasi:

- IETD-AFC per la caspasi-8;
- AEVD-AFC per la caspasi-10;



- ATAD-EFC per la caspasi-12.

Tutti i campioni così allestiti sono stati incubati a 37°C per 2 ore.

Durante l'incubazione, le caspasi attive esplicano la loro attività enzimatica per il proprio substrato, tagliandoli, causando la formazione di prodotti di reazione che emettono una fluorescenza giallo-verde ( $\lambda$  max: 505 nm) che viene rilevata spettrofotometricamente al TECAN.

## **Analisi statistica**

Tutti i dati rappresentano la media di almeno tre esperimenti indipendenti.

L'analisi statistica è stata condotta con il software R dalla *R Foundation for Statistical Computing* (Vienna, Austria).

I dati di *real time* sono stati analizzati da analisi a senso unico ANOVA con le misure ripetute, seguiti dal test Bartlett e Flingner-Killeen per l'omogeneità della varianza.

I dati di legame sono stati analizzati col il test t di Student. I valori  $p \leq 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

I dati ottenuti dalle piattaforme trascritto miche sono state valutati in accordo con le linee guida MIAME. I dati preliminari sono stati depositati nel *database Gene Expression Omnibus*, ad accesso pubblico.

## RISULTATI

Studi precedenti al presente lavoro hanno dimostrato che i T3s inducono apoptosi attraverso la modulazione di geni specifici nelle cellule MDA-MB-231 (Comitato *et al.*, 2009; Comitato *et al.*, 2010). Tale effetto è stato associato ad una cascata di segnalazione dovuta, a sua volta, all'attivazione e alla trasduzione mediata dei recettori  $\beta$  degli estrogeni.

Come precedentemente esposto, le analisi dei dati ottenuti dalle piattaforme trascrittomiche, confermate poi da ulteriori e recenti indicazioni apparse in letteratura (Wu e Ng, 2010), hanno avvalorato l'ipotesi della presenza di un effetto pro-apoptotico dei T3s, indipendente dalla segnalazione del recettore per gli estrogeni.

Pertanto, sono state utilizzate cellule della linea HeLa, che sono notoriamente prive di tali recettori, per verificare gli effetti dei tocotrienoli in loro assenza.

### Effetti della TRF e dei tocotrienoli

Uno dei primi passaggi di questa fase sperimentale, è stata la valutazione dell'espressione di particolari geni responsivi agli estrogeni poiché dotati, nelle regioni dei propri promotori, di determinate sequenze ERE (*estrogen response element*). I geni in questione sono *mic-1* e *cathepsin-D*, la cui espressione è stata determinata in condizioni basali e dopo i trattamenti della durata di 24 ore con TRF e T3s in concentrazioni crescenti.

La figura 1r A mostra che  $\gamma$ -T3 ,  $\delta$ -T3 e TRF hanno indotto un significativo aumento dell'espressione dell'mRNA di *mic-1*.

L' *up-regulation* di *mic-1* è stata significativa nei campioni sottoposti a trattamenti con le rispettive concentrazioni di 10  $\mu$ g/mL e 20  $\mu$ g/mL di  $\gamma$ -T3 (Fig. 1r A).

Nelle cellule trattate con l'isoforma  $\delta$ - dei tocotrienoli, è stato rivelato un aumento significativo già alla più bassa concentrazione impiegata nei trattamenti (5 mg/ml). In maniera contrastante, invece, non è stata rilevata nessuna modulazione dell'espressione di *cathepsin-D* (Fig. 1r B). Tale differente risultato

è probabilmente la conseguenza di una maggiore complessità del promotore di *mic-1*, rispetto a quello di *cathepsin-D* che contiene, invece, sequenze consenso per numerosi fattori di trascrizione che contribuiscono sinergicamente alla regolazione dell'espressione dello stesso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

In Fig. 2r sono mostrate le variazioni dei livelli di espressione del gene *mic-1* in seguito a pretrattamento di 30 minuti con ICI-182.780, a cui fanno seguito i trattamenti con tocotrenoli e TRF della durata di 24 ore.

Come appare evidente, in tutti i trattamenti ( $\gamma$ -T3: 20  $\mu$ g/mL;  $\delta$ -T3: 10  $\mu$ g/mL; TRF:  $\mu$ g/mL) preceduti dal pretrattamento con l'antagonista estrogenico, si registra un effetto modulatore inferiore esercitato dai tocotrienoli.

È stato ipotizzato, quindi, che l'ICI-182.780, presentando una struttura analoga a quella dell'estrogeno, compete e si lega ad un determinato sito candidato a *target* per i tocotrienoli.

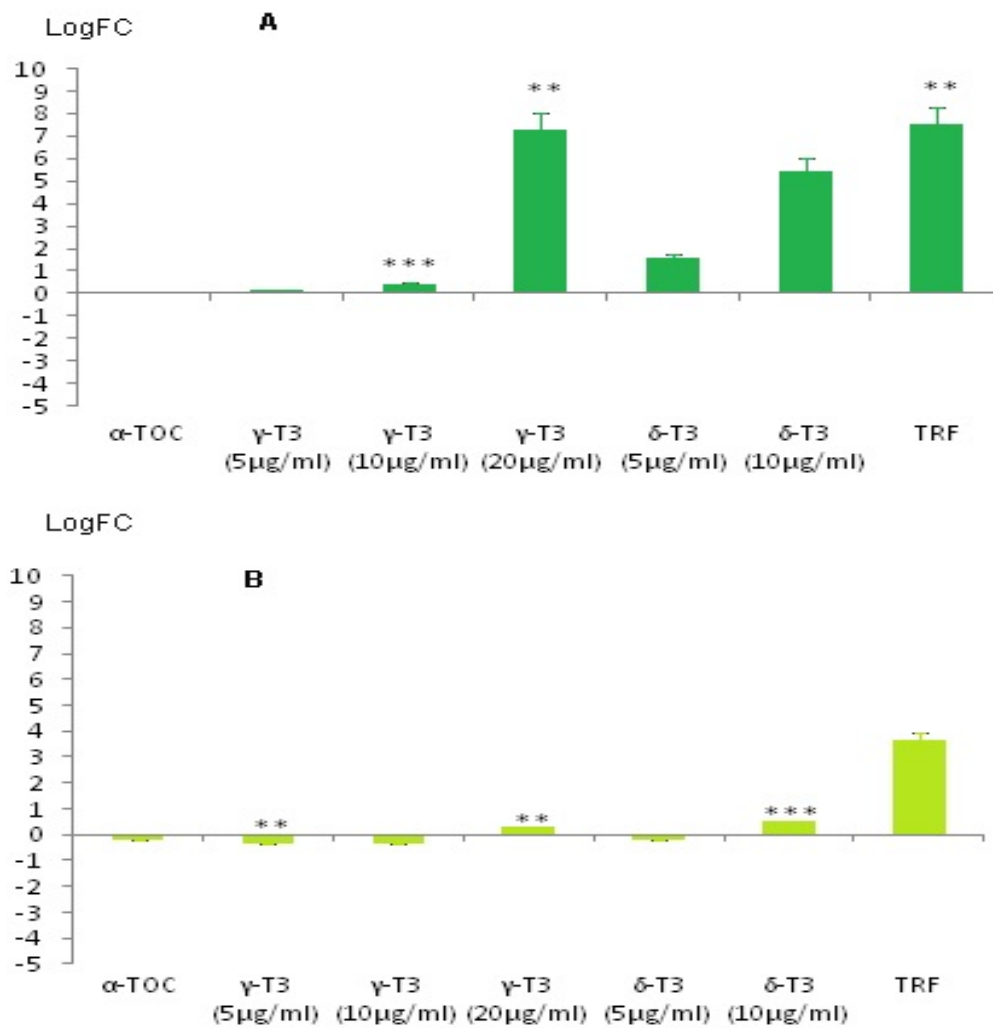
Inoltre, dopo 48 ore dalla somministrazione di T3s, è stato osservato un marcato *laddering*<sup>7</sup> del DNA genomico del campione cellulare esaminato (Fig. 2r), quale elemento distintivo dell'avvenuto fenomeno di morte cellulare per

---

<sup>7</sup> (cfr. "Apoptosi" di questa tesi).

apoptosi, i cui dati morfologici non vengono qui riportati.

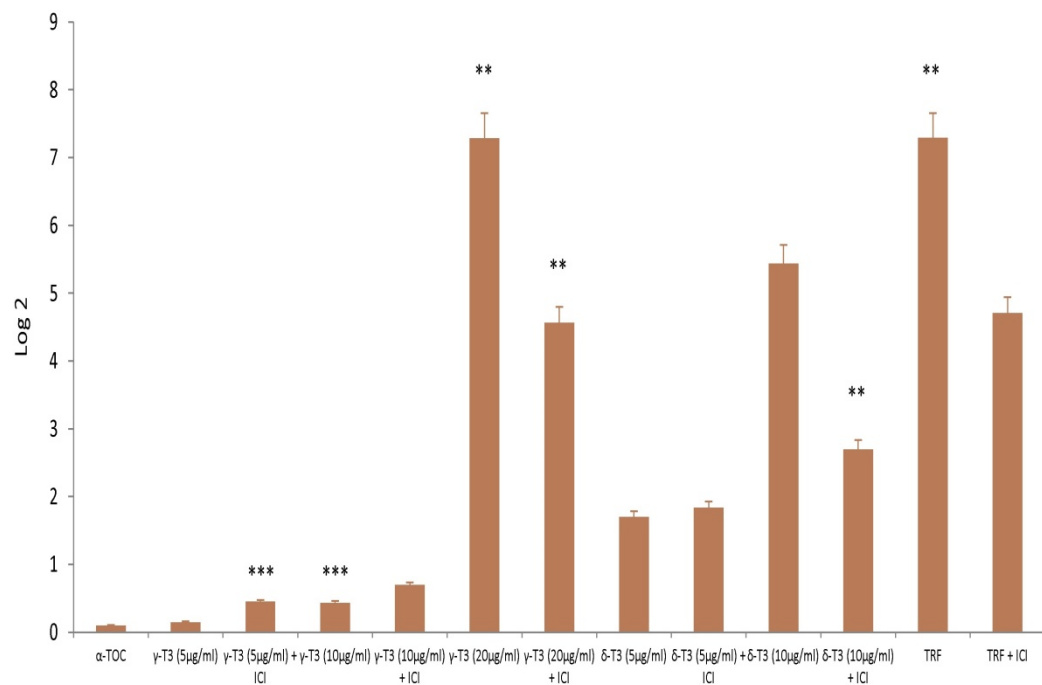
È opportuno ricordare che nella linea cellulare HeLa l'effetto apoptotico dei T3s è stato rilevabile solo 48 ore più tardi rispetto a quello verificatosi nelle cellule MCF-7 (Comitato *et al.*, 2010), sottolineando l'esistenza di un meccanismo differente che conduce all'apoptosi, che esula da quello trasdotto dai recettori per gli estrogeni modulati dai tocotrienoli.



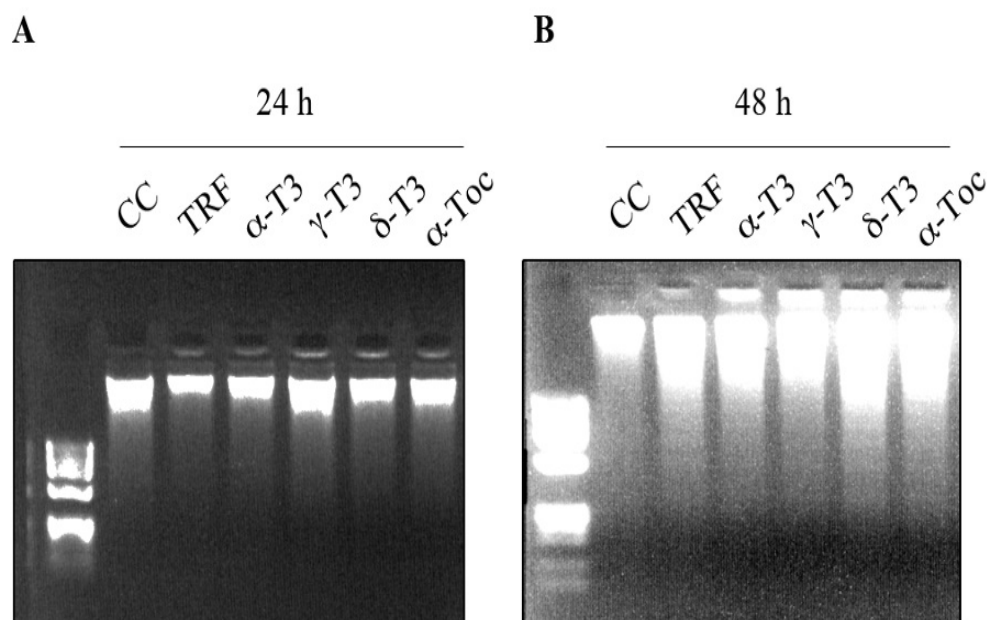
**Fig. 1r:** Modulazione dell'espressione dell'mRNA di *mic-1* (A) e *cathepsin-D* (B) nelle HeLa cells trattate con  $\alpha$ -tocoferolo,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienoli e TRF. Le differenze con il controllo sono significative ( $p \leq 0.05$ ) secondo il test Dunnett *post-hoc* test. La figura mostra il risultato di almeno tre esperimenti separati.



## mRNA expression of MIC-1



**Fig. 2r:** *Up-regulation* dell'espressione dell'mRNA di *mic-1* indotta dai trattamenti con T3s associati a pretrattamento con ICI-182.780. Tutte le differenze sono significative ( $p \leq 0.05$ ). Gli asterischi indicano che le differenze sono statisticamente rilevanti (\*\*  $\leq 0.01$ ; \*\*\*  $\leq 0.001$ ) determinate con il test Dunnet *post-hoc*. La figura mostra il risultato di almeno tre esperimenti separati.



**Fig. 3r:** T3s inducono l'apoptosi nelle HeLa cells come evidenziato dal laddering del DNA a 48 ore dall'inizio dei trattamenti. La figura mostra il risultato di almeno tre esperimenti separati.

## **Identificazione di meccanismi molecolari differenti modulati dai T3s nelle HeLa cells**

Sulla base delle precedenti osservazioni, gli studi sono proseguiti al fine di caratterizzare, con opportune analisi di *microarrays*, le variazioni dell'espressione dei trascritti delle HeLa cells, quali conseguenze dirette dei trattamenti con i tocotrienoli.

I profili dei geni differenzialmente espressi ottenuti dalle suddette analisi, sono stati ulteriormente sottoposti ad analisi funzionale con l'obiettivo di caratterizzare i processi biologici e i componenti cellulari implicati, annotati in GO (*Gene Ontology*) e modulati dai T3s.

Infine, attraverso l'associazione (*clustering*) delle similitudini "semantiche" (Bolshakova *et al.*, 2005; Lei e Dai, 2006) tra i termini avvalorati da GO, abbiamo confrontato il fenotipo trascrittomico osservato nelle cellule HeLa con quello della linea MCF-7, già precedentemente trattata con T3s e analizzata (Comitato *et al.*, 2010).

Le analisi di *microarray* evidenziano che nelle cellule HeLa i trattamenti

con  $\gamma$ -tocotrienolo e  $\delta$ -tocotrienolo sono associati ad un numero elevato di geni modulati (179 geni e 148 geni, rispettivamente), rispetto all'  $\alpha$ -tocotrienolo (21 geni) (Fig. 4r) .

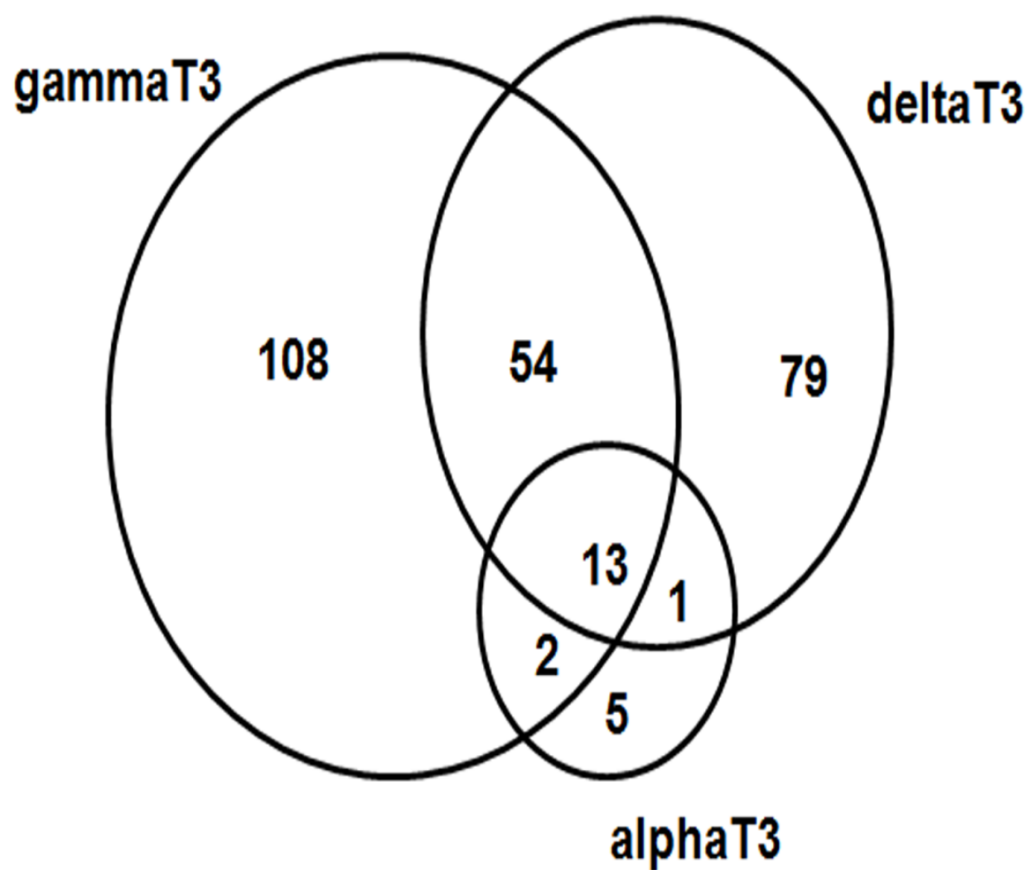
I profili di espressione sono solo parzialmente sovrapponibili. Infatti, in base all'incrocio delle liste dei geni differenzialmente espressi, solo un insieme di 13 geni è stato modulato analogamente da tutti i T3s con cui sono stati allestiti i trattamenti: otto geni, specificamente coinvolti in determinate fasi dei processi metabolici di steroli e steroidi, hanno subito una *down-regulation*:

- *dhcr-24*;
- *fads-2*;
- *fdft-1*;
- *idi-1*;
- *insig-1*;
- *ldlr*;
- *scd*;
- *srebfl*.

Gli ulteriori cinque geni rivestono ruoli differenti, in quanto sono implicati

in molteplici processi del metabolismo cellulare:

- *klf-7* è coinvolto nella regolazione dell'espressione dell'adiponectina (Cho e Shin, 2007);
- *lpin-1* e *fads-2* sono coinvolti nel controllo del metabolismo degli acidi grassi a differenti livelli (van Harmelen *et al.*, 2007; Letka *et al.*, 2010);
- *mmab* è implicato nella sintesi dei lipidi (Willer *et al.*, 2008) e *myo6* media processi di endocitosi a livello degli organelli intracellulari (Hasson, 2003).



**Fig. 4r:** Diagramma di Venn dei geni modulati dai trattamenti con i T3s nelle HeLa cells.

Come mostrato in Fig. 5r, i profili di espressione genica delle cellule MCF-7 ed HeLa, dopo il trattamento con  $\gamma$ -T3, sono parzialmente sovrapponibili. In entrambe le linee cellulari, infatti, le linee cellulari è stata osservata una significativa modulazione dei processi biosintetici (BP) di steroli e steroidi, così come del metabolismo delle molecole isoprenoidi.

Nelle cellule HeLa è stato osservato un potenziamento di processi biologici relativi alla regolazione del ciclo cellulare, del ciclo degli esosi e del metabolismo degli acidi carbossilici. Allo stesso modo, i profili di espressione differenti dei geni nelle cellule MCF-7, riguardano i processi biologici relativi alla regolazione dell'apoptosi, alla biosintesi delle citochine e al metabolismo del glutathione. Numerose evidenze sperimentali confermano il ruolo di questi processi nella regolazione di un fenotipo correlato ai programmi di morte cellulare (Kim *et al.*, 2006; Buchakjan e Kornbluth, 2010; Circu e Aw, 2012).

Inoltre nella linea cellulare HeLa, i profili di espressione differenziati dei geni modulano in modo specifico i processi correlati allo sviluppo tissutale e la regolazione della trascrizione, suggerendo l'attivazione di specifici meccanismi molecolari, diversi da quelli attivati nelle cellule MCF-7.

Una simile analisi funzionale è stata condotta al fine di determinare i compartimenti cellulari annotati in GO e maggiormente influenzati dai profili di espressione differenziati dei geni ora descritti.





Il trattamento delle HeLa cells con il  $\gamma$ -tocotrienolo determina principalmente la modulazione di geni i cui prodotti sono strutturalmente e funzionalmente connessi ai vari organelli citoplasmatici, in particolare il reticolo endoplasmatico.

Tale risultato ricalca quanto già evidenziato negli esperimenti precedenti condotti sulle cellule MCF-7 (Fig. 5r): il reticolo endoplasmatico è il *target* compartimentale dell'azione dei trattamenti con i T3s.

È opportuno notare che, nel sistema cellulare MCF-7, i trattamenti con  $\gamma$ -tocotrienolo conducono alla modulazione differenziale dell'espressione di geni i cui prodotti sono correlati ad organelli citoplasmatici differenti, quali mitocondri e apparato del Golgi.

Per valutare ulteriormente la relazione che intercorre tra il “fenotipo di morte” osservato e il coinvolgimento del reticolo endoplasmatico – attraverso l'analisi di arricchimento di GO – è stata affinata la ricerca per caratterizzare i profili di espressione di geni specificamente connessi allo stress del reticolo endoplasmatico indotto dai trattamenti con i T3s.

Attraverso l'utilizzo di un approccio di *data-mining*, è stata formulata una

lista di 568 geni per le evidenze presenti in letteratura che attribuiscono ad essi un particolare coinvolgimento nella determinazione dello stress del reticolo endoplasmatico. I profili dei geni differenzialmente espressi osservati negli esperimenti con le HeLa cells sono stati, quindi, mappati su tale lista.

Le molecole più attive nella modulazione dei geni correlati allo stress del reticolo endoplasmatico sono le isoforme  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3, rispetto all'isoforma  $\alpha$ -T3. Solo l'esiguo numero di 3 geni, tra tutti quelli rinvenuti, modulato nel senso di una down-regulation, in tutti i trattamenti allestiti. I geni in questione sono:

- *srebf-1* (Bravo *et al.*, 2013) ;
- *sdc*;
- *lpin-1* (Miranda *et al.*, 2010).

I trattamenti con  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3 conducono alla *down-regulation* di 3 geni:

- *srebf-2* (Bravo *et al.*, 2013);
- *cdkn-1a*;
- *id-2*.

Inoltre, gli stessi trattamenti causano l'*up-regulation* di 4 geni:

- *hspe-5*;

- *asns*;
- *phlda-1*;
- *gdf-15*.

Il trattamento con  $\gamma$ -tocotrienolo porta, in modo specifico, all'up-regulation di 7 geni:

- *ccnd-1*;
- *chac-1*;
- *dnajb-9*;
- *fas*;
- *gem*;
- *gfpt-1*;
- *xbp-1*.

Il trattamento con  $\delta$ -tocotrienolo, invece conduce alla *down-regulation* di 3 geni:

- *gsk3b*;
- *dnajc10*;
- *jun*.

Inoltre, si registra l'up-regulation per 4 geni al termine dei trattamenti con  $\delta$ -tocotrienolo:

- *sdf2l1*;
- *bcr*;
- *trib-3*;
- *fam-129a*.

Nell'insieme dei geni modulati vi sono specifici *markers* dello stress del reticolo endoplasmatico:

- *phlda1*;
- *asns*;
- *dnajb-9*;
- *cdkn-1a*;
- *fas*;
- *gsk-3b*;
- *sdf2l1*;
- *trib-3*;
- *fam-129a*.

Di seguito sono riportati i valori di FC per i geni selezionati la cui regolazione risulta variata dopo il trattamento con le varie forme di tocotrienoli. La raccolta dei dati è avvenuta secondo quanto riportato nella sezione “Materiali e metodi”, a cui si rimanda.

Geni	$\alpha$ -T3	$\delta$ -T3	$\gamma$ -T3
<b>dher-24</b>	-0.74472	-1.35393	-1.39376
<b>fdft-1</b>	-0.54879	-0.79437	-0.88976
<b>idi-1</b>	-0.85488	-1.12219	-1.43005
<b>insig-1</b>	-1.87219	-2.85928	-2.9887
<b>ldlr</b>	-1.29906	-2.19546	-2.28916
<b>scd</b>	-0.88979	-0.71617	-1.12246
<b>srebf-1</b>	-0.98529	-1.44445	-2.14544
<b>msmo-1</b>	-0.58297	-0.76624	-0.80292

**Tab. 1r:** *Fold Change* dei geni coinvolti nella biosintesi di steroidi e steroli dopo trattamento con T3s. I valori negativi indicano una *down-regulation*.

Geni	$\delta$ -T3	$\gamma$ -T3
<b>cdkn-1a</b>	-0.60774	0.55968
<b>vegfc</b>	0.855414	1.054681
<b>cdkn-1c</b>	-0.67979	-0.93532
<b>prune-2</b>	-0.62601	-0.68524
<b>il-11</b>	0.729763	1.128339
<b>asns</b>	1.372958	0.791913
<b>il6st</b>		0.525734
<b>aldoc</b>		-0.62268
<b>tns-3</b>		-0.60736
<b>ccnd-1</b>		0.548908
<b>osmr</b>		0.588282
<b>fosl-1</b>		0.717344
<b>Jun</b>	-0.52762	

**Tab 2r:** *Fold Change* dei geni coinvolti nella proliferazione cellulare e risposta alla carenza di nutrienti dopo trattamento con T3s. I valori negativi indicano una *down-regulation*. I valori positivi indicano una *up-regulation*.



<b>Geni</b>	<b><math>\delta</math>-T3</b>	<b><math>\gamma</math>-T3</b>
<b>srebf-2</b>	-0.70317	-0.95401
<b>cdkn-1a</b>	-0.64936	-0.64936
<b>id-2</b>	-0.60774	-0.60774
<b>scd</b>	-0.71617	-1.12246
<b>srebf-1</b>	-1.44445	-2.14544
<b>lpin-1</b>	-0.81	-0.76
<b>hsa-5</b>	0.934317	0.934317
<b>gdf-15</b>	1.042164	1.042164
<b>asns</b>	1.372958	1.372958

**Tab. 3r:** *Fold Change* dei geni coinvolti nello stress del reticolo endoplasmatico e nella carenza di nutrienti dopo trattamento con T3s. I valori negativi indicano una *down-regulation*. I valori positivi indicano una *up-regulation*.

Geni	$\delta$ -T3	$\gamma$ -T3
<b>sdf211</b>	0.53098	
<b>bcr</b>	0.574758	
<b>trib-3</b>	0.613723	
<b>fam-129a</b>	0.878811	
<b>dnajc-10</b>	-0.57204	
<b>gsk-3b</b>	-0.59168	
<b>xbp-1</b>		0.500861
<b>Fas</b>		0.51903
<b>ccdn-1</b>		0.548908
<b>dnajb-9</b>		0.621079
<b>gfpt-1</b>		0.632236
<b>chac-1</b>		0.763771
<b>gem</b>		0.865449

**Tab. 4r:** *Fold Change* dei geni modulati dopo trattamento con T3s, evidenziati con analisi di “*data mining*”. I valori negativi indicano una *down-regulation*. I valori positivi indicano una *up-regulation*.

Geni	$\alpha$ -T3	$\delta$ -T3	$\gamma$ -T3
<b>phlda-1</b>		0.504361	0.504361
<b>asns</b>		1.372958	1.372958
<b>dnajb-9</b>			0.621079
<b>fas</b>			0.51903
<b>gsk-3b</b>		-0.59168	
<b>trib-3</b>		0.613723	
<b>fam-129a</b>		0.878811	
<b>scd</b>	-0.88979	-0.71617	-1.12246
<b>hspa-5</b>		0.934317	0.9343317
<b>xbp-1</b>			0.500861

**Tab. 5r:** *Fold Change* dei geni, implicati nello stress del reticolo, modulati dopo trattamento con T3s, evidenziati con analisi di “*data mining*”. I valori negativi indicano una *down-regulation*. I valori positivi indicano una *up-regulation*.

### **I trattamenti con i T3s inducono rilascio di calcio dal reticolo**

Il profilo di espressione genica ottenuto dagli esperimenti di microarray, ulteriormente confermati dall'analisi di Real time PCR, conduce all'ipotesi della presenza a monte di un possibile stress del reticolo che induce all'apoptosi, dopo trattamento con i T3s.

Gli esperimenti successivamente condotti, quindi, sono stati finalizzati ad avvalorare la suddetta ipotesi.

In particolare, è stato valutato il rilascio di ioni calcio a livello del reticolo endoplasmatico, in quanto uno dei primi fenomeni dell'attuazione dello stress del reticolo.

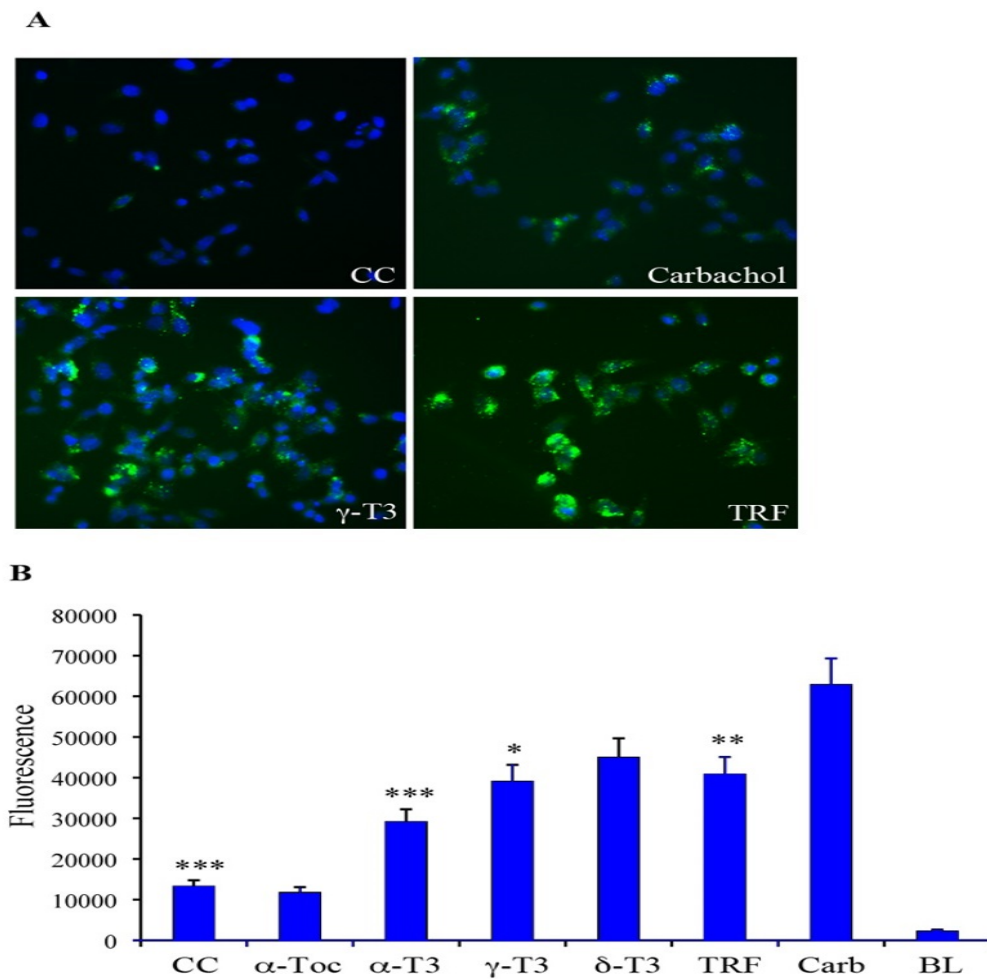
La Fig. 6r (A) mostra che i trattamenti con TRF (10 µg/mL) e γ-T3 (10 µg/mL) inducono il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  nel citoplasma. In particolare, il trattamento con γ-T3 (10 µg/mL) è associato ad una maggiore intensità della fluorescenza (Fluo4AM), rispetto allo stesso trattamento con TRF (10 µg/mL), suggerendo la possibilità di una più alta specificità di azione.

I dati di immunofluorescenza sono stati confermati da analisi quantitative

del rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$ , attuate con l'utilizzo dello stesso fluoroforo.

Come mostrato in Fig. 6r (B), i trattamenti con  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3 inducono un marcato rilascio di ioni calcio nel citoplasma, confermando il coinvolgimento dello stress del reticolo endoplasmatico nell'induzione dell'apoptosi ad opera delle molecole oggetto di studio.

È opportuno, inoltre, evidenziare come i trattamenti con  $\alpha$ -T3 e  $\alpha$ -TP non esplicano alcun effetto sul rilascio del  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando ulteriormente che gli effetti osservati sono strettamente dipendenti dalla struttura dell'isoforma di tococromanolo che agisce.



**Fig. 6r:** T3s inducono il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$ . Rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  visualizzato con immunofluorescenza (fluoroforo Fluo-4 AM) (A). Rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  rilevato con Calcium Assay (fluoroforo Fluo-4 AM) (B). Tutte le differenze sono significative ( $p \leq 0.05$ ). Gli asterischi indicano che le differenze sono statisticamente rilevanti ( $** \leq 0.01$ ;  $*** \leq 0.001$ ) determinate con T-test. La figura mostra il risultato di almeno tre esperimenti separati.

### **I trattamenti con i T3s inducono stress del reticolo**

Dopo 24 ore dai trattamenti con  $\gamma$ -tocotrienolo (20  $\mu\text{g/mL}$ ) e  $\delta$ -tocotrienolo (10  $\mu\text{g/mL}$ ), è stato registrato un aumento dell'espressione di *xbp-1* (*X-box binding protein-1*) e *chop* (*C/EBP homology protein*), due dei principali fattori coinvolti nella risposta dello stress del reticolo (Fig. 7r A e B). In ogni caso, il  $\delta$ -tocotrienolo ha mostrato una maggiore attività comparata a quella del  $\gamma$ -tocotrienolo.

L'espressione dell'mRNA di *chop* mostra, infatti, un apprezzabile aumento dopo trattamento con  $\delta$ -T3, anche alla concentrazione inferiore di 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Inoltre, così come già enunciato per il rilascio dello ione calcio, i trattamenti con  $\alpha$ -T3 e  $\alpha$ -TP non hanno sortito nessun effetto sull'espressione di tali geni (dati non mostrati).

L'RNA messaggero del fattore *xbp-1* si presenta in due forme alternative (uXBP-1 e sXBP-1) derivanti dal processo di *splicing* alternativo e distinte, quindi, in base alla presenza o meno di un singolo introne e media, quindi, la traduzione di due prodotti proteici differenti.

La digestione con l'enzima di restrizione Pst1 a carico della forma uXBP-1, porta alla formazione di due frammenti, mentre ciò non avviene a carico della forma sXBP-1, in quanto priva del sito di taglio dell'enzima, che cade proprio nella regione intronica. La forma sXBP-1 è tipica dello stress del reticolo endoplasmatico.

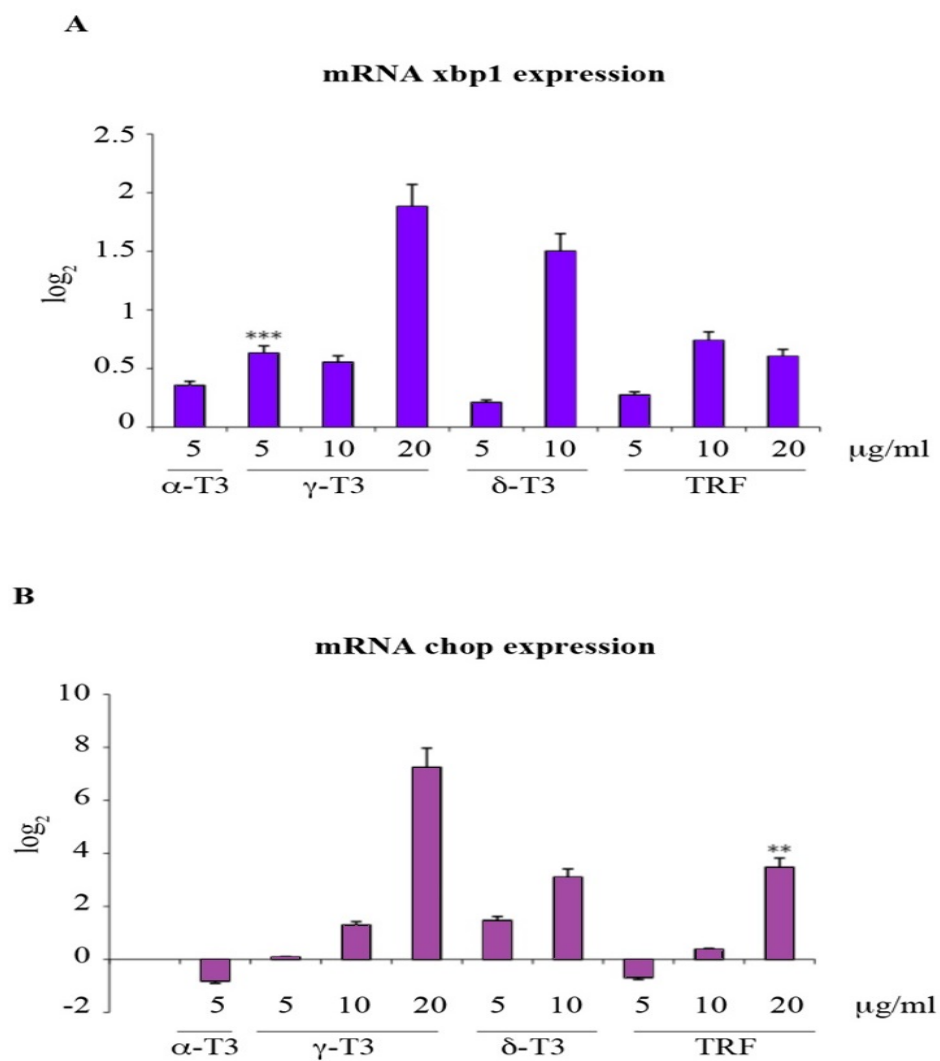
I trattamenti con  $\gamma$ -T3 (5  $\mu$ g/mL; 10  $\mu$ g/mL; 20  $\mu$ g/mL), con TRF (10  $\mu$ g/mL; 20  $\mu$ g/mL) e  $\delta$ -T3 (5  $\mu$ g/mL; 10  $\mu$ g/mL; 20  $\mu$ g/mL) inducono lo *splicing* alternativo di XBP1. Anche in questo caso, l' $\alpha$ -TP ha un effetto divergente, inducendo solamente l'espressione della uXBP1.

Come controllo positivo per lo stress del reticolo endoplasmatico, le HeLa cells sono state trattate con 5  $\mu$ g/mL di TM, una sostanza che induce stress del reticolo ed inibisce la N-glicosilazione delle proteine neosintetizzate (Li *et al.*, 2010). Dal momento che lo *splicing* alternativo di *xbp-1* è mediato da IRE-1 $\alpha$  (*inositol requiring enzyme-1 $\alpha$* ), è stato ipotizzato che i trattamenti con i T3s possono modulare, anche se indirettamente, l'attività del fattore IRE-1 $\alpha$ .

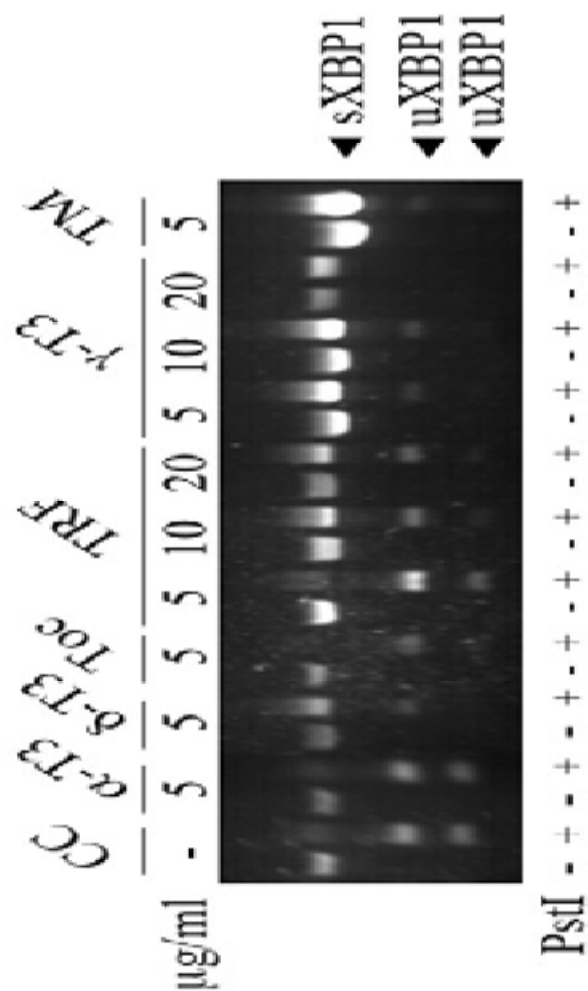
Durante la digestione con l'enzima di restrizione, la forma uXBP1 viene tagliata a livello del sito di taglio per Pst1 e si generano due frammenti della



sequenza, mentre ciò non avviene per la forma sXBP1, che si presenterà come sequenza unica. I risultati dell'avvenuta digestione consistono nella formazione di una coppia di bande separatesi durante la corsa elettroforetica, come mostrato in Fig. 8r.



**Fig. 7r:** T3s inducono l'espressione dei geni implicati nello stress del reticolo, quali, xbp-1 (A) e chop (B). Tutte le differenze sono significative ( $p \leq 0.05$ ). Gli asterischi indicano che le differenze sono statisticamente rilevanti ( $** \leq 0.01$ ;  $*** \leq 0.001$ ) determinate con T-test.



**Fig. 8r:** Elettroforesi dei prodotti di digestione con PstI. I trattamenti con  $\gamma$ -T3 (5-20  $\mu$ g/mL),  $\delta$ -T3 (5-20  $\mu$ g/mL) e TRF (10-20  $\mu$ g/mL) inducono lo splicing alternativo dell'mRNA di xbp-1.  $\alpha$ -TP non sortisce effetti. Dettagli sul protocollo sono forniti nel testo. La figura mostra il risultato di almeno tre esperimenti separati.

### **I trattamenti con i T3s attivano il pathway di IRE-1 $\alpha$**

Tre differenti *pathways* molecolari sono stati individuati e considerati responsabili nell'attuazione delle fasi dello stress del reticolo endoplasmatico (Bravo *et al.*, 2013).

Nello lavoro presentato sono stati studiati i profili di espressione di IRE-1 $\alpha$  (correlata al fattore XBP-1), di PERK (*protein kinase RNA [PRK]-like ER kinase*) e del fattore ATF-6 (*activating transcription factor-6*).

I trattamenti con i T3s sono stati condotti alle concentrazioni associate all'effetto più evidente per quanto concerne l'espressione dei geni.

Come controllo positivo per l'induzione dello stress del reticolo endoplasmatico, le HeLa cells sono state trattate con 2.5  $\mu$ g/mL di BFA, un metabolita fungino che inibisce la traslocazione delle proteine nelle cellule eucariotiche (come ad esempio, durante il trasporto di prodotti proteici verso la superficie cellulare per la secrezione o l'espressione in membrana), causando l'attivazione del sistema UPR (Upton *et al.*, 2012).

La figura 7 a mostra che i trattamenti con i T3s non inducono il taglio

proteolitico di ATF-6 o la fosforilazione di PERK, quanto piuttosto causano la fosforilazione di IRE-1 $\alpha$ . Al fine di confermare l'attivazione di IRE-1 $\alpha$ , è stata condotta un'osservazione nel tempo. Le HeLa cells, infatti, sono state incubate con 10  $\mu$ g/mL di  $\alpha$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo, per trattamenti con durata differente di 24, 26, 28 e 30 ore. È stato allestito, inoltre, un trattamento di controllo con DMSO, quale veicolo delle molecole dei tococromanoli utilizzati.

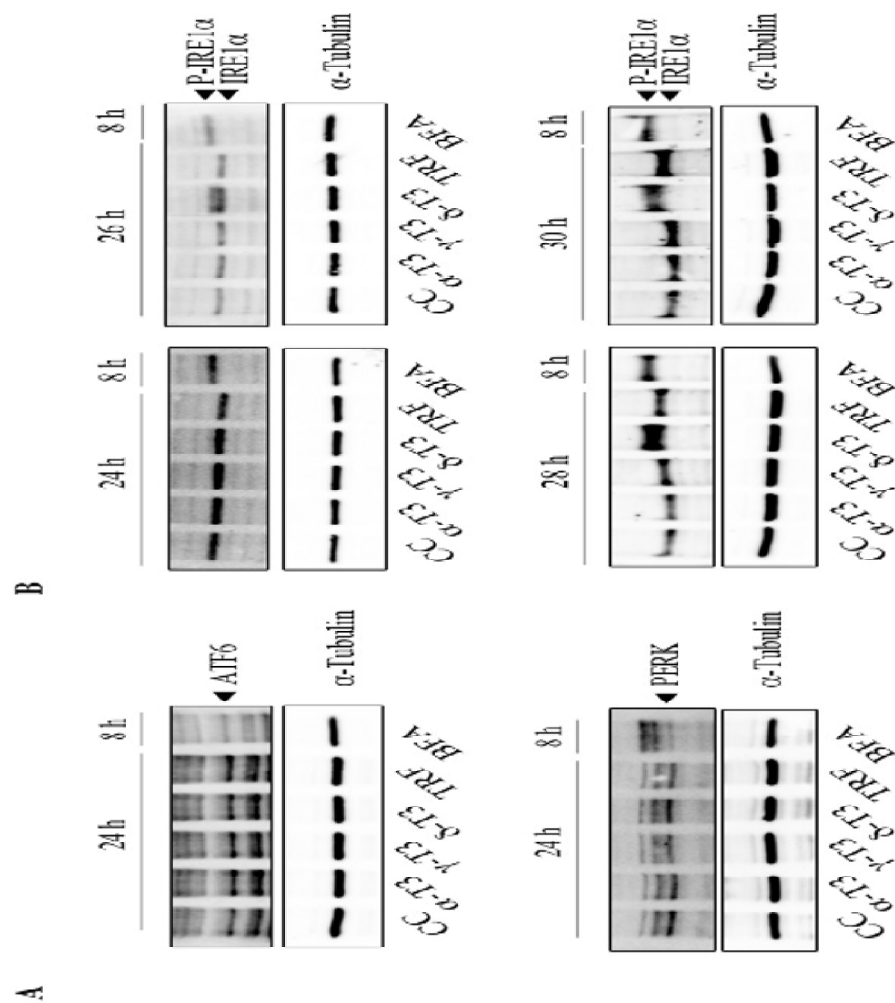
A 24 ore di trattamento con  $\delta$ -T3, l'isoforma fosforilata era appena rilevabile con un anticorpo specifico anti-IRE-1 $\alpha$ .

Dopo 26 ore, i trattamenti con  $\delta$ -T3 sono associati ad una variazione della mobilità elettroforetica di IRE-1 $\alpha$  se confrontata al controllo (cc), effetto che suggerisce la fosforilazione del fattore.

La variazione nella band di IRE-1 $\alpha$ , visualizzata nel campione di controllo positivo (BFA), ha confermato che la proteina è fosforilata e che, quindi, è stato attivato l'intero pathway che da essa dipende.

Inoltre, la prolungata esposizione ai  $\delta$ -T3 (28 e 30 ore) ha mostrato la fosforilazione del fattore IRE-1 $\alpha$ , indicando che l'attivazione viene mantenuta durante i trattamenti.

Questi risultati confermano, quindi, che i T3s sono in grado di causare stress del reticolo e attivare il meccanismo della UPR, per tentare un recupero, come dimostra l'attività di IRE-1 $\alpha$  mantenuta nei trattamenti protratti nel tempo.



**Fig. 9r:** I T3s influenzano i meccanismi intracellulari della UPR nelle HeLa cells. CC indica il trattamento con il veicolo DMSO. BFA è stato utilizzato con controllo positivo dell'inuzione di stress del reticolo.  $\alpha$ -tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Il trattamento con T3s non sortisce effetti sull'espressione delle proteine ATF-6 e PERK a 8 e 24 ore dal trattamento (A). L'espressione della proteina IRE-1 è significativamente influenzata dai trattamenti con T3s (B). La figura mostra il risultato di almeno tre esperimenti separati.

### **Effetti dei trattamenti con T3s sull'attività delle caspasi**

È ben noto, dai dati emergenti in letteratura, che lo stress del reticolo può condurre la cellula a morte programmata (Chakrabarti et al., 2011).

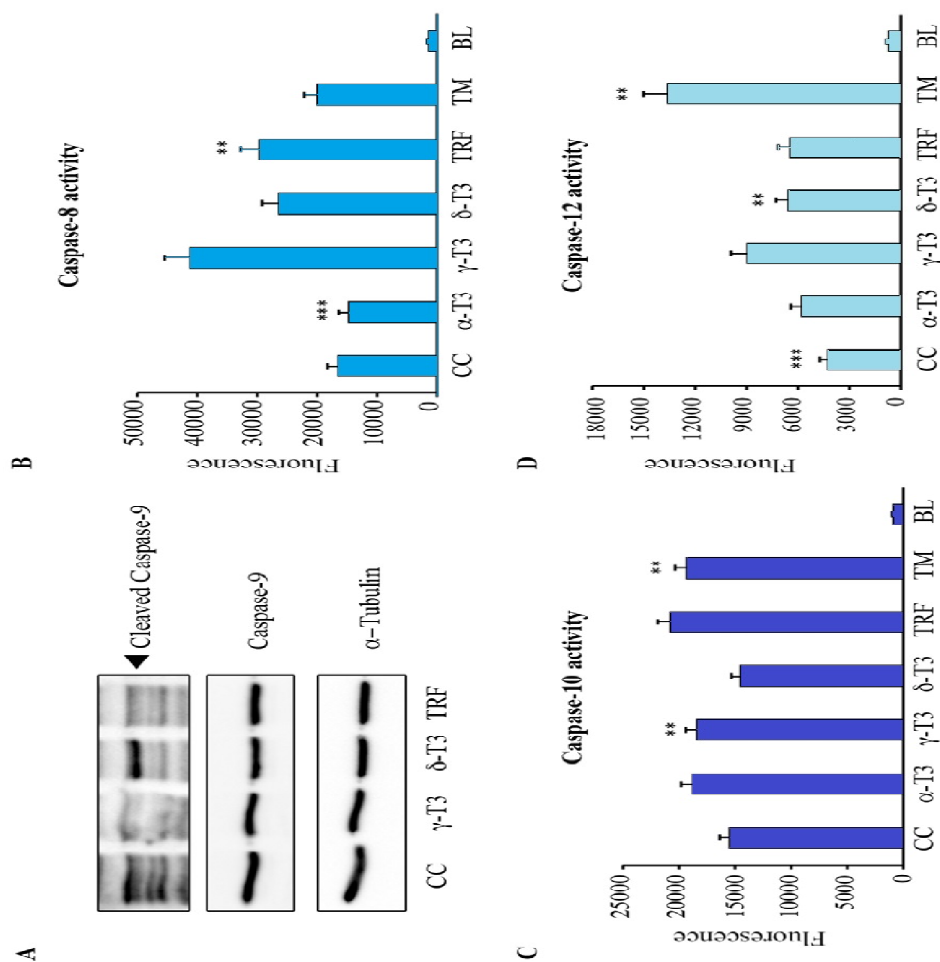
Dopo 12 ore dalla somministrazione di 10 µg/mL di  $\gamma$ -T3, è stato rilevato un incremento significativo delle attività delle caspasi-12 e caspasi -8 (Fig. 10r D e B, rispettivamente).

I trattamenti con le altre forme di tocotrienoli non hanno causato nessuna variazione determinabile con i sistemi di rilevamento impiegati.

Inoltre, l'attività della caspasi-10 non ha mostrato nessuna alterazione in tutti i trattamenti condotti (Fig. 10r C).

Infine, è stato registrato il taglio e la relativa attivazione della caspasi-9 a seguito dei trattamenti con  $\delta$ -T3, ma non in quelli con  $\gamma$ -T3, come mostrato in Fig. 10r A.





**Fig. 10r:** I trattamenti con T3s modulano i livelli di caspasi-9 (A) e l'attività della caspasi-8 (B), della caspasi-10 (C) e della caspasi-12 (D) nelle HeLa cells. CC: trattamenti con il veicolo DMSO. Tutte le differenze sono significative ( $p \leq 0.05$ ). Gli asterischi indicano che le differenze sono statisticamente rilevanti ( $** \leq 0.01$ ;  $*** \leq 0.001$ ) determinate con il test Dunnet post-hoc. La figura mostra il risultato di almeno tre esperimenti separati.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In base alle loro analogie strutturali, i tocoferoli ed i tocotrienoli sono comunemente riuniti in un'unica grande famiglia individuata col termine “vitamina E” (Niki e Traber, 2012), quale descrittore generico ampiamente diffuso per questa categoria di molecole.

Un elevato numero di evidenze sperimentali indica che, la presenza di una catena fitilica insatura, conferisce specifiche quanto distinte caratteristiche ai tocotrienoli che ne sono dotati.

Tocotrienoli e tocoferoli hanno, inoltre, differenti distribuzione tissutale e meccanismi di trasporto all'interno dell'organismo umano.

L' $\alpha$ -tocoferolo è trasportato nel fegato ad opera di uno specifico *carrier*, dove viene incorporato nelle HDL per poter essere trasferito alle altre lipoproteine e, quindi, gli altri tessuti, mentre  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocotrienolo vengono rilevati nel tessuto adiposo, nella pelle, nel cervello nel muscolo cardiaco, nel fegato umani (Brigelius-Flohe e Traber, 1999), ma soprattutto nel circolo ematico, in concentrazioni apprezzabili, in fasi postprandiali (Fairus *et al.*, 2006).

In passato, molte evidenze sperimentali sono state raccolte al fine di dimostrare la capacità dei tocotrienoli di indurre apoptosi in cellule di tumore

mammario umane e murine (Nesernam *et al.*, 1998), oltre che in numerosi altri tipi cellulari (Guthrie *et al.*, 1997; He *et al.*, 1997; McIntyre *et al.*, 2000; Conte *et al.*, 2004; Sylvester, 2005; Wada *et al.*, 2005; Srivastava, 2006).

In tempi più recenti, l'effetto benefico dei T3s nel trattamento degli stadi iniziali di tumore mammario, è stato confermato da un'opportuna sperimentazione clinica (Nesernam *et al.*, 2010). In tale contesto, l'attività dei T3s si mostra indipendente dalle proprie capacità antiossidanti e una quantità esigua di studi ne ha definitivamente evidenziato e caratterizzato i meccanismi molecolari.

Solo pochi anni fa, è stato dimostrato un nuovo meccanismo molecolare che presuppone l'interazione del  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3 con l'isoforma  $\beta$  (ER $\beta$ ) del recettore per gli estrogeni (Comitato *et al.*, 2009; Comitato *et al.*, 2010).

Negli studi menzionati è stato suggerito che il complesso attivato, formatosi dall'interazione tra T3/ER $\beta$ , trasloca nel nucleo e modula l'espressione di geni specifici che contengono, nei propri promotori, particolari sequenze responsive agli estrogeni (EREs). Tali geni, inoltre, sono correlati al processo apoptotico di morte cellulare.

Come precedentemente accennato, l'attività antiproliferativa dei T3s è stata evidenziata anche in altri numerosi tipi cellulari, compresi melanoma, cancro prostatico, carcinoma epatico e polmonare, oltre che nelle cellule HeLa (Wu *et al.*, 2010), una linea cellulare priva delle forme canoniche di recettori per gli estrogeni.

Da tali evidenze parte la considerazione della possibilità dell'esistenza di un *pathway* alternativo per la modulazione della proliferazione cellulare, che agisce in maniera indipendente da quello trasdotto dai recettori per gli estrogeni.

I primi esperimenti preliminari condotti e mostrati nel presente lavoro, infatti, dimostrano come i T3s modulano l'espressione di geni proapoptotici, contenenti anch'essi le sequenze EREs, all'interno della linea cellulare HeLa, dove i recettori per gli estrogeni sono assenti e non sono, quindi, responsabili diretti di tale modulazione.

È stata osservata, infatti, un significativo aumento dell'espressione di *mic-1* – un gene caratterizzato dalla presenza di un promotore complesso e, quindi, solo parzialmente responsivo all'estradiolo – dopo la somministrazione di  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3.

Sulla base di queste osservazioni preliminari, è stato pianificato e condotto un percorso sperimentale «*problem driven*», utilizzando analisi di microarray come approccio metodologico, per identificare i profili di espressione genica diversificati derivanti dai trattamenti delle HeLa cells con le varie isoforme di T3s.

Il processo di “*data mining*” ha mostrato una significativa modulazione di un gran numero di geni implicati nello stress del reticolo endoplasmatico, a seguito dei trattamenti con  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo.

Date le analogie emerse tra i processi biologici delle HeLa cells e la linea MCF-7, in seguito ai trattamenti con T3s, è stata focalizzata l’attenzione sul loro ruolo nell’attivazione dello stress del reticolo endoplasmatico, quale elemento comune tra le due linee cellulari evidenziato dai profili dei *microarrays*.

I dati del presente lavoro forniscono molte indicazioni a sostegno dell’ipotesi di un effetto specifico che i tocotrienoli esercitano a livello del reticolo endoplasmatico.

È stato dimostrato, infatti, che un ampio spettro di geni correlati alla regolazione strutturale e funzionale di tale compartimento cellulare, sono significativamente influenzati durante i trattamenti con T3s.

Tra questi, si riporta la *down-regulation* dell'espressione di *sdsc*, il cui ruolo è stato correlato ad un aumento dei fenomeni di stress del reticolo endoplasmatico e apoptosi, indotti dal palmitato (Green, 2011).

In modo analogo, si evidenzia la *down-regulation* del gene *lpin*, di cui è stato riportata la responsabilità nell'induzione dello stress reticolare (Miranda *et al.*, 2010).

La *down-regulation* è stata determinata anche per i geni *srebfl* e *srebf2* causata dai trattamenti con  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3. L'espressione di tali geni, ed in particolare di *srebf2*, è attivata con il *pathway* della UPR, al fine di fronteggiare lo stress del reticolo (Colgan *et al.*, 2007).

Le conclusioni dedotte dai dati riportati confermano, quindi, la capacità di  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3 di influenzare il meccanismo della UPR perché reagisca agli stimoli di stress a carico del reticolo endoplasmatico.

La specificità molecolare di tali effetti è abbastanza elevata, come dimostra la modulazione – dopo i trattamenti con tocotrienoli – dell'espressione di molti fattori di trascrizione implicati nei meccanismi di stress del reticolo.

I trattamenti con  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo comportano l'*up-regulation* di *hspa50*, un particolare chaperone molecolare che promuove il corretto *folding* proteico ed inibisce l'aggregazione delle proteine nel reticolo (Meunier *et al.*, 2002), confermando la loro azione specifica su tale compartimento cellulare.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi di *microarray*, è possibile dedurre che specifiche forme di tocotrienoli inducono apoptosi nelle HeLa cells attraverso lo stress del reticolo endoplasmatico.

Molti autori hanno identificato lo stress reticolare come uno dei *pathways* maggiormente implicati nell'induzione dell'apoptosi.

Inoltre, è noto che il processo apoptotico connesso al reticolo è strettamente associato al rilascio di ioni calcio nel citoplasma, in quanto fattori come Bcl-2 hanno la capacità di interagire con l'IP3-R (*inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*), quali recettori per il calcio a tipica localizzazione reticolare (Rong, 2008).



Nel presente studio, le HeLa cells rilasciano  $\text{Ca}^{2+}$  nel citoplasma in appena 15 minuti dall'inizio del trattamento con T3s.

Il reticolo endoplasmatico è un importante sito di stoccaggio per gli ioni calcio, contenendo concentrazioni anche centinaia di volte più elevate rispetto al citoplasma.

I livelli di ioni calcio nel reticolo sono regolati da canali specifici localizzati nelle sue membrane. Il manifestarsi delle condizioni di stress media il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dal lume reticolare che, nel citoplasma, agisce come segnale attivando l'apoptosi (Zhang, 2008).

Gli esperimenti condotti sulla linea cellulare HeLa hanno confermato la variazione dell'espressione di specifici geni correlati al reticolo endoplasmatico, il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  e l'attivazione del processo apoptotico.

Sulla base di tali evidenze sperimentali, sono stati finalizzati gli studi al fine di individuare quale dei tre principali *pathways* molecolari implicati nello stress del reticolo e ivi descritti, sia stato attivato nel modello sperimentale prescelto.

Come accennato, lo stress del reticolo è mediato da tre differenti proteine transmembrana, denominate PERK, ATF-6 e IRE-1 (Rone e Walter, 2007).

Tali fattori restano inattivi e legati a varie GRPs (*glauco-regulated proteins*), e in particolare a GRP-78 – comunemente definita anche BiP (*immunoglobulin heavy chain-binding protein*) – uno chaperone membro della famiglia HSP-70 (*heat-shock protein-70*), che gioca un importante ruolo nella regolazione dei *pathways* della UPR. Con il verificarsi delle condizioni di stress del reticolo, il complesso BiP/proteine reticolari è dissociato, con conseguenziale attivazione delle stesse (Chakabarti *et al.*, 2011).

Il presente lavoro dimostra che i trattamenti con T3s ( $\gamma$ -,  $\delta$ -, e TRF) non inducono sostanziali differenze nell'espressione dei fattori PERK e ATF-6, ma modulano significativamente quella di IRE-1 $\alpha$ .

Nonostante la fosforilazione di IRE-1 $\alpha$  è debolmente rilevabile a 24 ore dai trattamenti; lo *splicing* del precursore dell'mRNA di XBP-1 – una fase successiva alla stessa attivazione di IRE-1 – è stato determinato in modo evidente sia a 24 ore dai trattamenti, che in tempi di esposizione minori (12 ore) e maggiori (48 ore) (dati non mostrati).

L'apparente discrepanza tra i dati derivanti dalla valutazione della fosforilazione di IRE-1 $\alpha$  e dello *splicing* di XBP1 a 12 ore dall'inizio dei

trattamenti con T3s, può essere annoverata alla sensibilità ridotta dell'approccio metodologico impiegato, quale *western blot assay*, rispetto all'analisi PCR. Inoltre, dati non mostrati, indicano che la fosforilazione di IRE-1 $\alpha$  è comunque rilevabile a 12 ore dall'inizio dei trattamenti.

Il presente studio dimostra, quindi, che il fattore IRE-1 $\alpha$  oscilla tra due differenti stati, attivo e refrattario, mantenendo la sua attività endonucleasica. Tale interpretazione è supportata dal lavoro di Li e collaboratori (Li *et al.*, 2010), nel quale ha descritto un modello a tre stati per quanto concerne l'attivazione di IRE-1 $\alpha$  nei Mammiferi:

- uno stato «inattivo», che può essere attivato in condizioni di stress del reticolo;
- uno stato «attivo», nel quale IRE-1 $\alpha$  oligomerizza e avvia lo *splicing* di XBP-1;
- uno stato «refrattario», nel quale IRE-1 $\alpha$  entra dopo un'attivazione prolungata dovuta ad una più duratura risposta ad un'irrisolta condizione di stress del reticolo.

Gli autori hanno specificato come le forme di IRE-1 $\alpha$  non siano necessariamente riconosciute da uno specifico anticorpo anti-IRE-1 $\alpha$  e suggeriscono che la defosforilazione è un importante passaggio affinché il fattore entri nello stato refrattario.

Ishiwata e collaboratori (Ishiwata *et al.*, 2013) hanno dimostrato che, in condizioni di prolungato stress del reticolo (come ad esempio durante le carenze di inositolo), IRE-1 è continuamente attivato, anche se debolmente, attraverso la sua associazione, non comune, con il fattore BiP. In tale studio è stato ipotizzato che questa debole attività di IRE1 $\alpha$  è un sistema che permette alla cellula di adattarsi alle condizioni croniche di stress a carico del reticolo endoplasmatico.

Quando l'omeostasi non è ristabilita, la segnalazione della via UPR induce direttamente la cellula a morte per apoptosi (Bravo *et al.*, 2013).

Oltre al loro effetto su IRE-1, è stato osservato che i trattamenti con i T3s sono associati ad una significativa modulazione dell'espressione dell'mRNA di XBP-1 e CHOP, a partire dalle 24 ore dalla somministrazione delle molecole.

Il presente studio indica che i T3s sono in grado di indurre lo stress del reticolo endoplasmatico nelle cellule HeLa attraverso l'attivazione di IRE-1 $\alpha$  (che

fluttua tra una forma attiva ed una refrattaria), che a sua volta media lo *splicing* alternativo dell'RNA messaggero di XBP-1, oltre a modulare la trascrizione di CHOP. Le condizioni di stress del reticolo, soprattutto se prolungate, aumentano l'espressione di CHOP, che sposta la segnalazione dello stress del reticolo da un esito a favore della sopravvivenza in uno decisamente proapoptotico (Xu e Reed, 2005; Szegezdi *et al.*, 2006).

Come precedentemente accennato, infatti, le cellule che non riescono ad attuare un completo ripristino dell'omeostasi dopo le condizioni di stress e la degradazione di aggregati proteici, la via della UPR conduce all'arresto del ciclo cellulare e, successivamente all'apoptosi (Rasheva, 2009).

In altri termini, le condizioni sperimentali attuate (trattamenti con i T3s) per la conduzione del lavoro presentato, inducono le cellule della linea HeLa all'apoptosi.

Nel presente lavoro è stato dimostrato che le forme specifiche di T3s impiegate nei vari trattamenti eseguiti, sono stati in grado di attivare l'espressione della caspasi-12 e della caspasi-8.

Nonostante studi precedenti avessero già confermato le responsabilità dello stress del reticolo nell'attivazione delle suddette caspasi dopo trattamenti con T3s (Wali e Sylvester, 2009; Parke e Kline, 2010), nessun altro lavoro ha attribuito a queste molecole di interesse nutrizionale un ruolo nell'attivazione dell'apoptosi indotta da reticolo in modelli cellulari differenti dal tumore mammario.

È fondamentale ricordare che la caspasi-12, localizzata a livello del reticolo endoplasmatico, è attivata in modo specifico nelle condizioni di stress del reticolo e non dalla via estrinseca od intrinseca dell'apoptosi, che implica l'attivazione dei recettori di morte e lo stress mitocondriale, rispettivamente. Il rilascio di ioni calcio da parte del reticolo nelle condizioni di stress a proprio carico, può attivare la calpaina che, a sua volta, opera il taglio proteolitico e l'attivazione della caspasi-12 (Nakagawa e Yuan, 2000; Łopatniuk & Witkowski, 2011).

Altri studi propongono che l'attivazione della caspasi-12 avvenga ad opera del complesso IRE-1/TRF-2 (Rao e Frankowski, 2002), in maniera comunque indipendente alle vie “classiche” che conducono all'apoptosi.

La caspasi-12 attiva può innescare, una volta attivata, la cascata di morte attraverso la maturazione a catena a valle di altre cistein-proteasi, a partire dalla

pro-caspasi-9, che taglierà e attiverà la pro-caspasi-3, connettendo le varie vie di segnalazione che concludono il programma pro-apoptotico (Morishima *et al.*, 2002; Szgezdi e Samali, 2003).

Nelle HeLa cells è stata osservata l'attivazione della procaspasi-12, a cui fa seguito il taglio della caspasi-9, come dimostrano le evidenze sperimentali di altri studi riguardanti la correlazione tra stress del reticolo e morte cellulare per apoptosi (Chow *et al.*, 2013).

L'attivazione della caspasi-8 rilevata in questo studio è l'ulteriore anello di congiunzione delle varie vie che conducono la cellula in apoptosi, essendo essa la caspasi centrale della trasduzione mediata dai recettori di morte (via estrinseca) (Rahman *et al.*, 2009). Inoltre la caspasi-8 è indotta anche dal rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$ , ragion per cui non è possibile escludere il coinvolgimento del meccanismo dei suddetti recettori di morte nello spettro delle attività dei tocotrienoli.

Questi dati confermano il ruolo centrale della via della UPR nell'induzione dell'apoptosi ad opera dei T3s in cellule umane con origine differente dal tumore mammario.

Alcuni dati emersi dal presente studio hanno posto le basi per la formulazione di una nuova ipotesi, che sarà valutata in studi futuri.

Le osservazioni che ne derivano, infatti, hanno fatto ipotizzare che le forme specifiche di T3s ( $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo) legano un ipotetico recettore “specifico”, caratterizzato dalla presenza di una particolare tasca a cui si lega ICI-182.780 (Fig. 1d). Quest’ultimo è uno specifico antagonista degli estrogeni, in quanto compete per il legame al recettore specifico per essi.

Alcuni rilevamenti hanno indicato, in maniera inaspettata quanto chiara, che i pretrattamenti con ICI-182.780 inficiano gli effetti dei T3s sull’espressione del gene mic-1 anche nelle HeLa cells, notoriamente prive delle forme canoniche dei recettori per gli estrogeni.

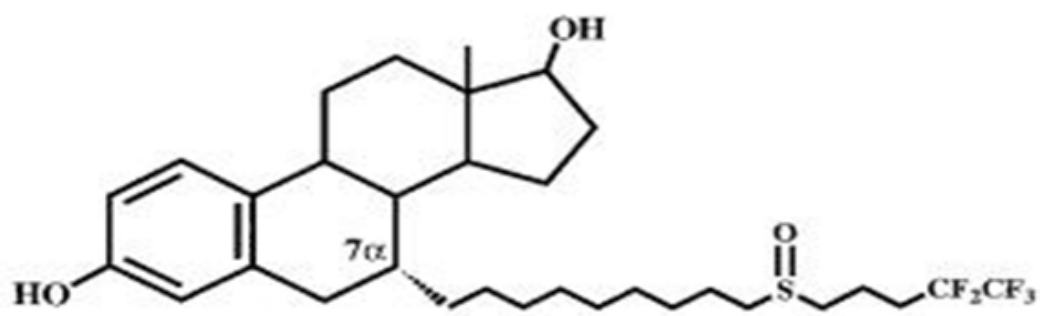
Da questa ipotesi deriva la deduzione che il  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocotrienolo possono legare questo ipotetico “recettore orfano”, ed inibirne la funzionalità.

Il recettore “candidato ideale” dovrebbe essere localizzato a livello del reticolo endoplasmatico, in accordo alle caratteristiche chimico-fisiche e funzionali degli stessi T3s.



Conseguentemente l'attivazione di questo recettore dovrebbe innescare lo stress del reticolo, l'attivazione di IRE-1 e lo splicing di XBP-1.

Dal momento della sua sintesi, sXBP-1 dovrebbe modulare l'espressione di uno specifico gruppo di geni, contenente *chop*.



**Fig. 1d:** Struttura molecolare di ICI-182.780.

Il presente studio dimostra che il  $\gamma$ -tocotrienolo e il  $\delta$ -tocotrienolo possono attivare una serie di risposte cellulari specifiche che conducono all'apoptosi cellule prive di recettore  $\beta$  per gli estrogeni.

È stato identificato e caratterizzato un *pathway* molecolare che dipende dallo stress del reticolo endoplasmatico, attivato dalle stesse forme di tocotrienoli e che coopera con la via di segnalazione dei recettori  $\beta$  degli estrogeni (quando presenti), nell'induzione dell'apoptosi in un gran numero di cellule tumorali.

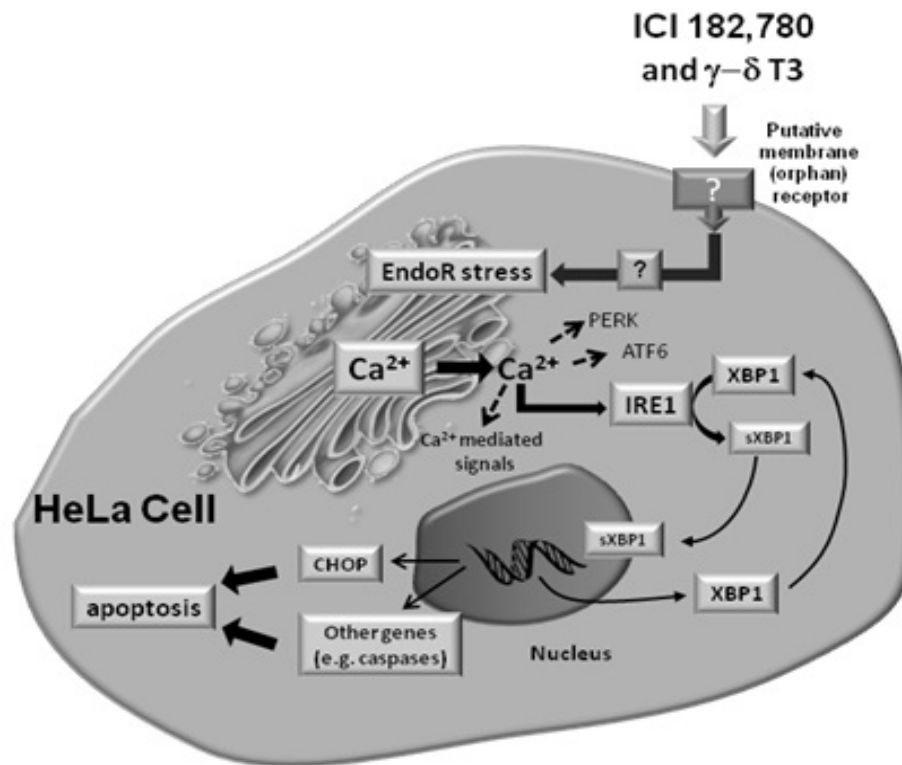
Studi futuri muoveranno alla determinazione dei meccanismi molecolari con cui  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3 inducono stress del reticolo.

Le osservazioni riportate in questo lavoro aprono nuove strade per esplorare il ruolo del consumo umano di tocotrienoli in campo nutrizionale e, possibilmente, nella profilassi di specifiche forme tumorali.

Infine, il lavoro presentato dimostra che i T3s possiedono specifiche funzioni chiaramente diversificate da quelle dei TP. Infatti negli esperimenti mostrati, l' $\alpha$ -tocoferolo non è stato in grado di indurre il rilascio di ioni calcio,

l'attivazione della via di trasduzione della UPR e l'apoptosi nella linea cellulare HeLa.

I dati presentati, insieme ai risultati di altri lavori, rinforzano l'intento, già esplicitato Hendrich e collaboratori (Hendrich *et al.*, 1994) e ivi ulteriormente ribadito: distinguere e separare i tocotrienoli dagli altri componenti del più ampio gruppo della vitamina E, i tocoferoli, al fine di racchiuderli in un'ulteriore differente famiglia.



**Fig. 2d:** In cellule tumorali che non esprimono le forme canoniche di recettori per gli estrogeni ( $\alpha$  e  $\beta$ ),  $\gamma$ -T3 e  $\delta$ -T3 inducono stress del reticolo attivando rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  nel citoplasma. Inoltre, il trattamento con specifiche forme di T3s, ma non con l' $\alpha$ -TP, è associato a specifiche segnalazioni Ca-dipendenti coinvolte nella UPR, quale meccanismo cardine delle cellule eucariotiche per fronteggiare lo stress del reticolo endoplasmatico. In particolare, il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  è seguito dall'attivazione di IRE-1 che, a sua volta, attiva lo splicing di XBP-1, che porta alla sintesi di uno specifico fattore che si lega al DNA e la conseguente induzione dell'espressione di geni pro-apoptotici. L'espressione di altri geni correlati allo stress del reticolo (PERK e ATF-6) non è influenzata in modo significativo dai trattamenti con i T3s. Il presente lavoro costituisce il background per ricercare la presenza di un possibile recettore (orfano), localizzato a livello della membrana cellulare, capace di legare i T3s e altri antagonisti estrogenici come ICI-182.730. Tale meccanismo può essere attivo in molti tipi cellulari, indipendentemente dalla presenza di recettori per gli estrogeni funzionali.

## BIBLIOGRAFIA

## Articoli scientifici

Adam A, Marzuki A, Ngah W Z, Top G M. *Nitrofurantoin-induced hepatic and pulmonary biochemical changes in mice fed different vitamin E doses*. Pharmacol Toxicol. 1996; 79: 334–339.

Aggarwal B B, Sundaram C, Prasad S, Kannappan R. Tocotrienols, *the Vitamin E of the 21<sup>st</sup> Century: it's potential against cancer and other chronic diseases*. Biochem Pharmacol. 2010; 80(11): 1613-1631.

Al-Qusairi L, Laporte J. *T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases*. Skelet Muscle. 2011; 1:26.

Araki E, Oyadomari S, Mori M. *Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus*. Exp Biol Med. 2003; 228:1213-1217.

Arita M, Nomura K, Arai H, Inoue K. *Alpha-tocopherol transfer protein stimulates the secretion of alpha-tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway*. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America. 1997; 94: 12437-12441.

Ashby MC, Tepikin AV. *ER calcium and the functions of intracellular organelles*. Semin Cell Dev Biol. 2001; 12: 11–17.

Atkinson J, Epand R F, and Epand R M. *Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review*. Free radical biology & medicine. 2008; 44: 739-764.

Azlina MF, Nafeeza M I, Khalid B A. *A comparison between tocopherol and tocotrienoleffects on gastricparameters in ratsexposed to stress*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 2005; 14: 358-65.

Benyamini P, Webster P, Meyer DI. *Knockdown of p180 eliminates the terminal differentiation of a secretory cell line*. Mol Biol Cell. 2009; 20:732–744.

Bernales S, McDonald KL, Walter P. *Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response*. Plos Biol. 2006; 4:e423.

Bernales S, Schuck S, Walter P. *ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum*. Autophagy. 2007; 3:285–287.

Bierenbaum M L et al. *Palm oil antioxidant effects in patients with hyperlipidemia and carotid stenosis*. Asia Pacific J Clin. Nutr. 1995; 6: 72-75.

Birringer M, Pfluger P, Kluth D, Landes N, Brigelius-Flohé R. *Identities and differences in the metabolism of tocotrienols and tocopherols in HepG2 cells*. The Journal of Nutrition. 2002; 132: 3113-3118.

Black T M, Wang P, Maeda N, Coleman R A. *Palm tocotrienols protect ApoE +/- mice from diet-induced atheroma formation*. J. Nutr. 2000; 130: 2420-2426.



Boden G, Song W, Duan X, Cheung P, Kresge K, Barrero C, Merali S. *Infusion of glucose and lipids at physiological rates causes acute endoplasmic reticulum stress in rat liver*. Obesity (Silver Spring). 2011; 19: 1366–1373.

Bolshakova N, Azuaje F, Cunningham P. *A knowledge-driven approach to cluster validity assessment*. Bioinformatics. 2005; 21:2546-2547.

Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA, Wagner KH. Vitamin E. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000; 80: 913-938.

Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez A E, Torrealba N, Paredes F, Wang Z V, Zorzano A, Hill J A, Jaimovich E, Quest A F G, Lavandero S. *Endoplasmic Reticulum and the Unfolding Protein Response: dynamics and metabolic integration*. Int Rev Cell Mol Biol. 2013; 301: 315-290.

Bravo R, Vicencio JM, Parra V, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, Quiroga C, Rodriguez AE, Verdejo HE, Ferreira J, et al. *Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress*. J Cell Sci. 2011; 124: 2143–2152.

Brigelius-Flohe R, Traber M G. *Vitamin E: function and metabolism*. Faseb J. 1999; 13: 1145-1155.

Brigelius-Flohé R, Traber M. *Vitamin E: function and metabolism*. FASEB J. 1999; 13 (10): 1145-55.

Buchakjian M R, Kornbluth S. *The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010; 11: 715-727.

Burton G W, Ingold K U. *Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant*. Ann N Y Acad Sci. 1989; 570: 7-22.

Burton G W, Joyce A, Ingold K U. *First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma*. Lancet. 1982; 2(8293): 327.

Butler A E., Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza R A, Butler P C. *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes. 2003; 52: 102-110.

Chakrabarti A, Chen A W, Varner J D. *A review of the Mammalian Unfolded Protein Response*. Biotechnol Bioeng. 2011; 108 (12): 2777-2793.

Chang EC, Frasor J, Komm B, Katzenellenbogen BS. *Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells*. Endocrinology. 2006; 147:4831-4842.

Chao J T, Gapor A, Theriault A. *Inhibitory effect of delta-tocotrienol, a HMG CoA reductase inhibitor, on monocyte-endothelial cell adhesion*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2002; 48: 332–337.

Cho S Y P P, Shin H J, et al. *Catechin suppresses expression of Kruppel-like factor 7 and increases expression and secretion of adiponectin protein in 3T3-L1 cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007; 292: 1166-1172.

Chow CK, Draper HH. *Isolation of gamma-tocotrienol dimers from Hevea latex*. Biochemistry 1970;9(2):445–50.

Chow S E, Kao C H, Liu Y T, Cheng M L, Yang YW, Huang Y K, Hsu C C, Wang J S. *Resveratrol induced ER expansion and ER caspase-mediated apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells*. Apoptosis. 2013

Circu M L, Aw T Y. *Glutathione and modulation of cell apoptosis*. Biochim Biophys Acta. 2012; 1823:1767-1777.

Colgan S M T D, Werstuck GH, Austin RC. *Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2*. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39: 1843-1851.

Colombo M L. *An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienols perspective*. Molecules. 2010; 15: 2103-2113.

Combs G F. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. London: Academic Press Inc. 1992.

Comitato R, Leoni G, Canali R, Ambra R, Nesaretnam K, Virgili F. *Tocotrienols activity in MCF-7 breast cancer cells: involvement of ERbeta signal transduction*. Molecular Nutrition & Food Research. 2010; 54: 669-678.

Comitato R, Nesaretnam K, Leoni G, Ambra R, Canali R, Bolli A, Marino M, Virgili F. *A novel mechanism of natural vitamin E tocotrienol activity: involvement of ER $\beta$  signal transduction.* American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2009; 297: 427-437.

Conte C FA, Aisa C, Piroddi M, Floridi A, Galli F. *Gammatocotrienol metabolism and antiproliferative effect in prostate cancer cells.* Annals of the New York Academy of Sciences. 2004; 1031: 391-394.

Corbett E F, Oikawa K, Francois P, Tessier D C, Kay C, Bergeron J J, Thomas D Y, Krause K H, Michalak M. *Ca<sup>2+</sup> regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones.* J Biol Chem. 1999; 274: 6203–6211.

Cui F F, Pan Y Y, Dai Y L, Wang Z G, Xiao J, Jilang L P. *Effects of endoplasmic reticulum stress related proteins and their mediated apoptosis in the formation of deep tissue injury of pressure ulcer in rats.* Zhonghua Shao Shang Za Zhi. 2013; 29(5): 448-53.

Deluca H F, Engstrom G W. *Calcium uptake by rat kidney mitochondria.* Proc Natl Acad Sci USA. 1961; 47: 1744–1750.

Dreier L, Rapoport TA. *In vitro formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction.* J Cell Biol. 2000; 148:883–898.

Dunphy PJ, Whittle KJ, Pennock JF, Morton RA. *Identification and estimation of tocotrienols in Hevea latex.* Nature 1965;201:521–522.

Eizirik D L, Cardozo A K , Cnop M. *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. Endocr. Rev. 2008; 29: 42–61.

Eizirik D L, Darville M I. *Beta-cell apoptosis and defence mechanisms: lessons from type 1 diabetes*. Diabetes. 2001; 50: 64-69.

Esterhuyse A J, Toit E D, Rooyen J V. *Dietary red palm oil supplementation protects against the consequences of global ischemia in the isolated perfused rat heart*. Asia Pac J Clin Nutr. 2005; 14: 340–347.

Fairus S, Nor R M, Cheng H M, Sundram K. *Alpha-tocotrienol is most abundant tocotrienoli isomer circulated in plasma and lipoproteins after postprandial tocotrienoli-rich vitamin E supplementation*. Nutrition Journal. 2012; 11:5.

Fang F, Kang Z, Wong C. *Vitamin E tocotrienols improve insulin sensitivity through activating peroxisome proliferator-activated receptors*. Molecular Nutrition & Food Research. 2010; 54:345–352.

Glembotski C C. *Endoplasmic reticulum stress in the heart*. Circ Res. 2007; 101: 975–984.

Green C D O L. *Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells by stearoyl-CoA desaturase and Elovl6*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011; 300: 640-649.

Grigoriev I, Gouveia SM, van der Vaart B, Demmers J, Smyth JT, Honnappa S, Splinter D, Steinmetz MO, Putney JW, Hoogenraad CC, et al.

*STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER.* Curr Biol. 2008; 18: 177–182.

Gu J Y, Wakizono Y, Sunada Y, Hung P, Nonaka M, Sugano M, et al. *Dietary effect of tocopherols and tocotrienols on the immune function of spleen and mesenteric lymph node lymphocytes in Brown Norway rats.* Biosci Biotechnol Biochem 1999; 63: 1697–1702.

Guthrie N G A, Chambers A F, Carroll K K. *Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination.* Journal of Nutrition. 1997; 127: 544S-548S.

Hasson T. *Myosin VI: two distinct roles in endocytosis.* J Cell Sci 2003; 116: 3453-3461.

He L M H, Hadisusilo S, Qureshi A A, Elson C E. *Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo.* Journal of Nutrition. 1997; 127: 668 - 674.

Hermizi H, Faizah O, Ima-Nirwana S, Ahmad Nazrun S, Norazlina M. *Beneficial effects of tocotrienol and tocopherol on bone histomorphometric parameters in sprague-dawley male rats after nicotine cessation.* Calcif Tissue Int. 2009; 84:65–74.

Herrera E, Barbas C. *Vitamin E: action, metabolism and perspectives.* J Physiol Biochem. 2001; 57 (2): 43-56.

Horvath G, Wessjohann L, Bigirimana J, Jansen M, Guisez Y, Caubergs R, Horemans N. *Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues.* Phytochemistry 2006;67(12):1185–95.

Hsieh T C, Wu J M. *Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells.* Int J Oncol. 2008; 33: 851–859.

Ima-Nirwana S, Suhaniza S. *Effects of tocopherols and tocotrienols on body composition and bone calcium content in adrenalectomized rats replaced with dexamethasone.* J Med Food. 2004; 7: 45–51.

Ishiwata-Kimata Y P T, Kohno K, Kimata Y. *BiP-bound and nonclustered mode of Ire1 evokes a weak but sustained unfolded protein response.* Genes Cells. 2013; 18: 288-301.

Kawano M, Kumagai K, Nishijima M, Hanada K. *Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT.* J Biol Chem. 2006; 281: 30279–30288.

Khanna S, Parinandi N L, Kotha SR, Roy S, Rink C, Bibus D, et al. *Nanomolar vitamin E alphanatocotrienol inhibits glutamate-induced activation of phospholipase A2 and causes neuroprotection.* J Neurochem. 2010; 112: 1249–1260.

Khanna S, Roy S, Park H A, Sen C K. *Regulation of c-Src activity in glutamate-induced neurodegeneration*. J Biol Chem 2007; 282: 23482–23490.

Khanna S, Roy S, Ryu H, Bahadduri P, Swaan P W, Ratan R R, et al. *Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration*. J Biol Chem 2003; 278: 43508–43515.

Khanna S, Roy S, Slivka A, Craft T K, Chaki S, Rink C, et al. *Neuroprotective properties of the natural vitamin E alpha-tocotrienol*. Stroke 2005; 36: 2258–2264.

Kim Y H, Heo J S, Han H J. *High glucose increase cell cycle regulatory proteins level of mouse embryonic stem cells via PI3-K/Akt and MAPKs signal pathways*. J Cell Physiol. 2006; 209: 94-102.

Koba K, Abe K, Ikeda I, Sugano M. *Effects of alpha-tocopherol and tocotrienols on blood pressure and linoleic acid metabolism in the spontaneously hypertensive rat (SHR)*. Biosci Biotechnol Biochem. 1992; 56: 1420–1423.

Kuhad A, Chopra K. *Tocotrienol attenuates oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy*. Neuropharmacology. 2009; 57: 456–462.

Kurrer M O, Pakala S V, Hanson H L, Katz J D. *Beta cell apoptosis in T cell- mediated autoimmune diabetes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997; 94: 213-218.



Lattka E I T, Koletzko B, Heinrich J. *Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism*. Curr Opin Lipidol. 2010; 21: 64-69.

Lee S P, Mar G Y, Ng L T. *Effects of tocotrienol-rich fraction on exercise endurance capacity and oxidative stress in forced swimming rats*. Eur J Appl Physiol 2009; 107: 587–595.

Lei Z, Dai Y. *Assessing protein similarity with Gene Ontology and its use in subnuclear localization prediction*. BMC Bioinformatics. 2006; 7: 491.

Lekli I, Ray D, Mukherjee S, Gurusamy N, Ahsan M K, Juhasz B, et al. *Co-ordinated autophagy with resveratrol and gamma-tocotrienol confers synergetic cardioprotection*. J Cell Mol Med. 2009

Leth T, Sondergaard H. *Biological activity of vitamin E compounds and natural materials by the resorption-gestation test, and chemical determination of the vitamin E activity in foods and feeds*. J Nutr. 1977; 107(12): 2236-2243.

Li H, Korennykh A V, Behrman S L, Walter P. *Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 16113-16118.

Li J, Yan Y, Wang Q, Sun L, Wang J. *Effect of N-linked glycosylation on secretion and activity of recombinant DSPA $\alpha$ 1 expressed in Pichia pastoris*. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2010; 26: 1287-1292.

Li X, Zhang K, Li Z. *Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective*. J Hematol Oncol. 2011; 23 (4): 8.

Liu L, Fan Z, Tang Y, Ke Z. *The Resveratrol Attenuates Ethanol-Induced Hepatocyte Apoptosis Via Inhibiting ER-Related Caspase-12 Activation and PDE Activity In Vitro*. Alcohol Clin Exp Res. 2013; doi: 10.1111/acer.12311.

Łopatniuk P, Witkowski J M. *Conventional calpains and programmed cell death*. Acta Biochim Pol. 2011; 58(3): 287-96.

Mathis D, Vence L, Benoist C. *Beta-Cell death during progression to diabetes*. Nature. 2001; 14: 792-798.

McIntyre B S B K, Tirmenstein M A, Fariss M W, Gapor A, Sylvester P W. *Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells*. Lipids. 2000; 35: 171-180.

Meunier L, Usherwood Y K, Chung K T, Hendershot L M. *A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins*. Mol Biol Cell. 2002; 13: 4456-4469.

Miranda M E X, Ceperuelo-Mallafré V, Megía A, Caubet E, Näf S, Gómez J M, González-Clemente J M, Vicente V, Vendrell J. *Relation between human LPIN1, hypoxia and endoplasmic reticulum stress genes in subcutaneous and visceral adipose tissue*. Int J Obes. 2010; 34: 679-686.

Miranda M, Escoté X, Ceperuelo-Mallafré V, Megía A, Caubet E, Näf S, Gómez J M, González-Clemente J M, Vicente V, Vendrell J. *Relation between*

*human LPIN1, hypoxia and endoplasmic reticulum stress genes in subcutaneous and visceral adipose tissue.* International Journal of Obesity 34: 679-86, 2010.

Mishima K, Tanaka T, Pu F, Egashira N, Iwasaki K, Hidaka R, et al. *Vitamin E isoforms  $\alpha$ -tocotrienol and  $\gamma$ -tocopherol prevent cerebral infarction in mice.* Neurosci Lett. 2003; 337: 56–60.

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. *An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12.* The Journal of Biological Chemistry. 2002; 277: 34287-34294.

Nakagawa T, Yuan J. *Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis.* The Journal of Cell Biology. 2000a; 150: 887-894.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N. *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ .* 2000b; Nature 403:98–103.

Nesaretnam K, Ambra R, Selvaduray K R, Radhakrishnan A, Reimann K, Razak G, Virgili F. *Tocotrienol-rich fraction from palm oil affects gene expression in tumors resulting from MCF-7 cell inoculation in athymic mice.* Lipids. 2000a; 39: 459-467.

Nesaretnam K, Ambra R, Selvaduray K R, Radhakrishnan A, Canali R, Virgili F. *Tocotrienol-rich fraction from palm oil and gene expression in*

*humanbreast cancer cells*. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004b; 1031:143-157.

Nesaretnam K, Selvaduray K R, Abdul Razak G, Veerasenan SD , Gomez P A. *Effectiveness of tocotrienol-rich fraction combined with tamoxifen in the management of women with early breast cancer: a pilot clinical trial*. Breast Cancer Res. 2010; 12: R81.

Nesaretnam K, Stephen R, Dils R, Darbre P. *Tocotrienols inhibit the growth of human breast cancer cells irrespective of estrogen receptor status*. Lipids. 1998; 33: 461-469.

Newaz M A, Nawal N N. *Effect of gamma-tocotrienol on blood pressure, lipid peroxidation and total antioxidant status in spontaneously hypertensive rats (SHR)*. Clin Exp Hypertens 1999; 21: 1297–1313.

Niki E, Traber M G. *A history of vitamin E*. Ann Nutr Metab. 2012; 61: 207-212.

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. *Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta: a potential inhibitor of estrogen action in human*. Nucleic Acids Research. 1998; 26: 3505-3512.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A H, Iwakoshi N N, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher L H, Hotamisligil G S. *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science. 2004; 306: 457–461.

Panfili G, Fratianni A, Irano M. *Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals*. J Agric Food Chem 2003;51(14):3940–4.

Park S K SB, Kline K. *Tocotrienols induce apoptosis in breast cancer cell lines via an endoplasmic reticulum stress-dependent increase in extrinsic death receptor signaling*. Breast Cancer Research and Treatment. 2010; 124: 361-375.

Parker R A, Pearce B C, Clark R W, Gordon D A, Wright J J. *Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase*. J Biol Chem 1993; 268: 11230–11238

Pearce B C, Parker R A, Deason M E, Dischino D D, Gillespie E, Qureshi A A, et al. *Inhibitors of cholesterol biosynthesis. 2. Hypocholesterolemic and antioxidant activities of benzopyran and tetrahydronaphthalene analogues of the tocotrienols*. J Med Chem 1994; 37: 526–541.

Pearce B C, Parker R A, Deason M E, Qureshi A A, Wright J J. *Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols*. J Med Chem 1992; 35: 3595–3606.

Peretti D, Dahan N, Shimoni E, Hirschberg K, Lev S. *Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-mediated transport*. Mol Biol Cell. 2008; 19:3871–3884.

Pfaffl M W. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res. 2001; 1; 29(9): e45.

Pickup J.C., Williams G. (eds). *Textbook of Diabetes (2nd ed.)*. Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK. 1997.

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. *Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores*. Physiol Rev. 1994; 74: 595–636.

Qureshi A A, Mo H, Packer L, Peterson D M. *Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties*. Journal of Agricultural & Food Chemistry. 2000; 48(8): 3130–40.

Qureshi A A, Pearce B C, Nor RM, Gapor A, Peterson D M, Elson C E. *Dietary alpha-tocopherol attenuates the impact of gamma-tocotrienol on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in chickens*. J Nutr. 1996; 126(2): 389-394.

Qureshi A A, Peterson D M, Hasler-Rapacz J O, Rapacz J. *Novel tocotrienols of rice bran suppress cholestrogenesis in hereditary hypercholesterolemic swine*. J. Nutr. 2001a; 131: 223-230.

Qureshi A A, Quareschi N, Hasler-Rapacz J O et al. *Dietary tocotrienols reduce concentrations of plasma cholesterol, apolipoprotein B, tromboxane B2 and platelet factor 4 in pigs with inherited hyperlipidemias*. Am J Clin Nutr. 1991; 53: 1042S-1046S.

Qureshi A A, Sami S A, Salser W A, Kham F A. *Synergistic effect of tocotrienol-rich fraction (TRF) of rice bran and lovastatin on lipid parameters in hypercholesterolemic humans*. J Nutr Biochem. 2001b; 12: 318-329.

Qureshi AA, Bradlow BA, Brace L et al. *Response of hypercholesterolemic subject to administration of tocotrienols*. Lipids.1995; 30: 1171-1177.

Rahman M M, Mohamed M R, Kim M, Smallwood S, McFadden G. *Co-regulation of NF-kappaB and inflammasome-mediated inflammatory responses by myxoma virus pyrin domain-containing protein M013*. PLoS Pathog. 2009 5: e1000635.

Rao R V, Castro-Obregon S, Frankowski H. *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway*. . The Journal of Biological Chemistry. 2002; 277: 21836-21842.

Rasheva V I D P. *Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis*. Apoptosis. 2009; 14: 996-1007.

Renuka Devi R, Arumughan C. *Antiradical efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran*. Food Chem Toxicol 2007; 45: 2014–2021.

Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. *Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses*. Science. 1998; 280:1763–1766.

Ron D, Walter P. *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8: 519-529.

Rong Y D C. *Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis*. Annu Rev Physiol. 2008; 70: 73-91.

Rossini A A, Mordes J P, Like A A. *Immunology of insulin-dependent diabetes mellitus*. Annu. Rev. Immunol. 1985; 3: 289–320.

Roy S, Lado B H, Khanna S, Sen C K. *Vitamin E sensitive genes in the developing rat fetal brain: a high-density oligonucleotide microarray analysis*. FEBS Lett. 2002; 530: 17–23.

Scheuner D, Kaufman R J. *The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with b-cell failure and diabetes*. Endocr. Rev. 2008; 29: 317–333

Schöntthal A H. *Endoplasmatic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy*. Scientifica. 2012

Sen C K, Khanna S, Roy S, Packer L. *Molecular basis of vitamin E action. Tocotrienol potently inhibits glutamate-induced pp60(c-Src) kinase activation and death of HT4 neuronal cells*. J Biol Chem 2000; 275: 13049–13055.

Sen C K, Khanna S, Roy S. *Tocotrienols in health and disease: the other half of natural vitamin E family*. Mol Aspects Med. 2007; 28 (5-6): 692-728.

Sen C K, Khanna S, Roy S. *Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols*. Life Sci. 2006; 78 (18): 2088-2098.

Sen CK, Khanna S, Rink C, Roy S. *Tocotrienols: the emerging face of natural vitamin E*. Vitam Horm 2007;76:203–261.



Shibata Y, Voeltz G K, Rapoport T A. *Rough sheets and smooth tubules*. Cell. 2006; 126:435–439.

Shuid A N, Mehat Z, Mohamed N, Muhammad N, Soelaiman I N. *Vitamin E exhibits bone anabolic actions in normal male rats*. J Bone Miner Metab. 2010; 28: 149–156.

Sontag T J. and Parker R S. *Influence of major structural features of tocopherols and tocotrienols on their omega-oxidation by tocopherol-omega-hydroxylase*. J. lipid res. 2007; 48: 1090-1098.

Srivastava J K, Gupta S. *Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006; 346: 447-453.

Sugano M, Koba K, Tsuji E. *Health benefits of rice bran oil*. Anticancer Research 1999;19(5A):3651–7.

Sundram K, Sambanthamurthi R, Tan Y. *Palm fruit chemistry and nutrition*. Asia Pacific J Clin Nutr. 2003; 12 (3): 355-362.

Sylvester PW SS. *Mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of vitamin E in mammary cancer cells*. Frontiers in Bioscience. 2005; 10: 699-709.

Szegezdi E F U, Samali A. *Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far*. Ann N Y Acad Sci. 2003; 1010:186-194.

Szegezdi E L S, Gorman A M, Samali A. *Mediators of endoplasmicreticulum stress-induced apoptosis*. EMBO Reports. 2006; 7: 880-885.

Tarrago-Trani M T, Phillips K M, Lemar L E, Holden J M. *New and existing oils and fats used in products with reduced trans-fatty acid content*. J Am Diet Assoc 2006;106(6):867–80.

Theriault A et al.  *$\delta$ -tocotrienol is the most effective vitamin E for reducing expression of adhesion molecules*. Proceedings National Congress of American Association for Clinical Chemistry. 2000.

Theriault A, Chao J T, Gapor A. *Tocotrienol is the most effective vitamin E for reducing endothelial expression of adhesion molecules and adhesion to monocytes*. Atherosclerosis 2002; 160: 21–30.

Tiwari V, Kuhad A, Bishnoi M, Chopra K. *Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidativenitrosative stress in rats*. Pharmacol Biochem Behav.2009a; 93: 183–189.

Tiwari V, Kuhad A, Chopra K. *Suppression of neuro-inflammatory signaling cascade by tocotrienoli can prevent chronic alcohol-induced cognitive dysfunction in rats*. Behav Brain Res 2009c; 203: 296– 303.

Tiwari V, Kuhad A, Chopra K. *Tocotrienol ameliorates behavioral and biochemical alterations in the rat model of alcoholic neuropathy*. Pain. 2009b; 145: 129–135.

Traber M G, Sokol R J, Burton G W, Ingold K U, Papas A M, Huffaker J E, Kayden H J. *Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate alpha-tocopherol into lipoproteins secreted by the liver.* The Journal of Clinical Investigation. 1990; 85: 397-40.

Upton J P, Wang L, Han D, et al. *IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2.* Science. 2012; 338: 818-822.

van Harmelen V R M, Sjölin E, Hoffstedt J. *Role of lipin in human obesity and insulin resistance: relation to adipocyte glucose transport and GLUT4 expression.* J Lipid Res 2007; 48: 201-206.

Vasington F D, Murphy J V. *Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation.* J Biol Chem. 1962; 237: 2670–2677.

Viola V, Pilolli F, Piroddi M, Pierpaoli E, Orlando F, Provinciali M, Betti M, Mazzini F, Galli F. *Why tocotrienols work better: insights into the in vitro anti-cancer mechanism of vitamin E.* Genes Nutr. 2012; 7: 29-41.

Voeltz G K, Prinz W A, Shibata Y, Rist J M, Rapoport T A. *A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum.* Cell. 2006; 124:573–586.

Wada S S Y, Murakoshi M, Noguchi N, Yoshikawa T, Nishino H. *Tumor suppressive effects of tocotrienol in vivo and in vitro.* Cancer Letters. 2005; 229: 181-191.

Wali V B B S, Sylvester P W. *Endoplasmic reticulum stress mediates  $\gamma$ -tocotrienol-induced apoptosis in mammary tumor cells*. Apoptosis. 2009; 14: 1366-1377.

Wang F, He H, Cai M. *Effect of antioxidant vitamins on lipid peroxide injury of aortic endothelial cells induced by oxidatively modified low-density lipoprotein in vitro*. Wei Sheng Yan Jiu. 1999; 28(2):97-100.

Wang H, Kouri G, Wollheim C B. *ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity*. J Cell Sci. 2005; 118: 3905–3915.

Wang X, Quinn P. *Vitamin E and its function in membranes*. Prog Lipid Res. 1999; 38 (4): 309-36.

Whittle K J, Dunphy P J, Pennock J F. *The isolation and properties of delta-tocotrienol from Hevea latex*. Biochemical Journal 1966;100(1):138–45.

Willer C J S S, Jackson A U, Scuteri A, Bonnycastle L L, Clarke R, Heath S C, Timpson N J, Najjar S S, Stringham H M, Strait J, Duren W L, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Albai G, Swift A J, Morken M A, Narisu N, Bennett D, Parish S, Shen H, Galan P, Meneton P, Hercberg S, Zelenika D, Chen W M, Li Y, Scott L J, Scheet P A, Sundvall J, Watanabe R M, Nagaraja R, Ebrahim S, Lawlor D A, Ben-Shlomo Y, Davey-Smith G, Shuldiner A R, Collins R, Bergman R N, Uda M, Tuomilehto J, Cao A, Collins FS, Lakatta E, Lathrop G M, Boehnke M, Schlessinger D, Mohlke K L, Abecasis GR. *Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease*. Nat Genet 2008; 40: 161-169.

Wu S J, Liu P L, Ng L T. *Tocotrienol-rich fraction of palm oil exhibits anti-inflammatory property by suppressing the expression of inflammatory mediators in human monocytic cells*. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008; 52: 921-929.

Wu S J, Ng L T. *Tocotrienols inhibited growth and induced apoptosis in human HeLa cells through the cell cycle signaling pathway*. *Integr Cancer Ther*. 2010; 9: 66-72.

Xu C B-MB, Reed JC. *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115: 2656-2663.

Zhang K K R. *Identification and characterization of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in vivo*. *Methods Enzymol*. 2008; 442: 395-419.